

**Die Expression  
der  $\beta$ 3-Integrin-Rezeptor-Untereinheit  
und des VEGF-Rezeptors 2  
in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

**doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Mandy Laun-Hartung

geboren am 27. Juli 1984 in Mühlhausen

**Gutachter**

- 1. PD Dr. med. Claus Wittekindt, Universitätsklinikum Gießen/ Marburg**
- 2. Prof. Dr. med. Orlando Guntinas-Lichius, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Christian Mawrin, Universitätsklinikum Magdeburg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 17. September 2013**

In Liebe und Dankbarkeit  
Christian und meinen Eltern  
gewidmet

## Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

A.	Arteria, Arterie
AK	Antikörper
DEEB	Dual Endogenous Enzyme Block, Mittel zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase
gp	Glykoprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HPF	high-power field, hochauflösendes Gesichtsfeld
HPV	humanes Papillomavirus
IHC	Immunhistochemie
LSAB-Methode	Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode, markiertes Streptavidin-Biotin Methode
M.	Musculus, Muskel
OS	overall survival, Gesamtüberleben
PAK	Primärantikörper
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction, quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RFS	recurrence-free survival, rezidivfreies Überleben
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAK	Sekundärantikörper
VEGF	Vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor, Rezeptor für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>9</b>
2.1. Oropharynxkarzinom	9
2.2. Physiologie und Pathologie der Angiogenese	12
2.2.1. Tumorinduzierte Angiogenese	12
2.3. Integrin-Rezeptoren	13
2.3.1. $\beta$ 3-Integrin-Rezeptor-Untereinheit	14
2.3.2. Stand der Therapie mit Integrin-Inhibitoren	16
2.4. VEGF-Rezeptor 2	16
2.4.1. Stand der Therapie mit VEGF-Rezeptor 2-Inhibitoren	17
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>4. Patientendaten, Material und Methoden</b>	<b>20</b>
4.1. Patientendaten	20
4.2. Material	21
4.2.1. Primärantikörper	21
4.2.2. Chemikalien und Reagenzien	22
4.2.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
4.3. Methoden	23
4.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
4.3.2. Immunhistochemie	24
4.3.3. Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	24
4.3.4. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	26
4.3.5. Statistische Auswertung	26
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>28</b>
5.1. Biometrische Daten	28
5.2. Onkologisches Outcome	30
5.3. Ergebnisse der Immunhistochemie	33
5.3.1. Ergebnisse der $\beta$ 3-Integrin-Immunhistochemie	34
5.3.2. Ergebnisse der VEGF-Rezeptor 2-Immunhistochemie	36
5.4. Prognose	39
<b>6. Diskussion</b>	<b>42</b>
6.1. $\beta$ 3-Integrin-Rezeptor-Untereinheit	42

6.1.1.	Expression der $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit und Tumorprogression__	43
6.1.2.	Immunzellen und die $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit _____	46
6.2.	VEGF-Rezeptor 2_____	49
6.3.	HPV-Infektion und Angiogenese _____	52
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerung _____</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis _____</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>Anlagen _____</b>	<b>59</b>
9.1.	Lebenslauf _____	59
9.2.	Danksagung_____	60
9.3.	Ehrenwörtliche Erklärung_____	61

## 1. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich stehen an 6. Stelle aller Krebserkrankungen weltweit. Karzinome des Oropharynx (Mundrachen) sind dabei die zweithäufigste Tumorentität. Die Gesamt-5-Jahres-Überlebensrate liegt geschätzt bei etwa 50% über allen Stadien. Diese schlechte Überlebensrate kann unter anderem auf eine hohe Rate regionärer lymphogener Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose und eine hohe Rate lokaler Tumorrezidive in der Nachbeobachtungszeit zurückgeführt werden. An Behandlungsverfahren stehen neben einer Operation die Anwendung ionisierender Strahlen und Chemotherapeutika sowie die jeweiligen Kombinationen der genannten Verfahren (multimodale Therapie) zur Verfügung. Die in den letzten Jahrzehnten unverändert schlechte Prognose der Erkrankung sowie erhebliche Nebenwirkungen der multimodalen Therapie geben bei dieser Tumorentität Anlass zur Suche nach molekularen Markern und neuen Therapieansätzen.

Ein möglicher neuer Therapieansatz ist eine zielgerichtete Hemmung einer tumorinduzierten Gefäßneubildung (Angiogenese). Der VEGF-Rezeptor 2 und die  $\beta 3$ -Integrin-Rezeptor-Untereinheit spielen bei tumorinduzierter Angiogenese sowie Tumorprogression und -metastasierung eine wichtige Rolle. Ziel dieser Arbeit war es, zuerst die Expression des VEGF-Rezeptors 2 und der  $\beta 3$ -Integrin-Rezeptor-Untereinheit in Präparaten von Karzinomen des Oropharynx in frühen Tumorstadien (T1 und T2) und zugehöriger Lymphknotenmetastasen immunhistochemisch zu ermitteln und anschließend einen putativen Zusammenhang zwischen dieser Expression und der Metastasierung und dem onkologischen Outcome der Patienten zu untersuchen. Hierzu wurden die Präparate von 46 Oropharynxkarzinomen und 27 dazugehörigen Lymphknotenmetastasen mit Antikörpern gegen den VEGF-Rezeptor 2 und die  $\beta 3$ -Integrin-Rezeptor-Untereinheit immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Daten zum onkologischen Outcome wurden mit Hilfe der Datenbank des Tumorzentrums Jena und der Patientenakten erfasst.

Nach Auswertung der Färbereaktionen ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit der regionären Metastasierung bei beiden untersuchten

Rezeptoren. Eine schwache Färbereaktion des anti-VEGF-Rezeptor 2-Antikörpers in Tumorzellen war jedoch mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten verknüpft ( $p=0,047$ ). Bei der  $\beta 3$ -Integrin-Rezeptor-Untereinheit war eine schwache Färbereaktion des anti-Integrin  $\beta 3$ -Antikörpers in Tumorzellen mit einem längeren Gesamtüberleben der Patienten verknüpft ( $p=0,023$ ). Zusammengefasst war die immunhistochemische Expression dieser angiogeneseassoziierten molekularen Marker zwar nicht mit der regionären Metastasierung, jedoch mit dem onkologischen Outcome der Patienten verknüpft. Hierdurch ergeben sich Grundlagen für zukünftige weiterführende Untersuchungen auf dem Gebiet angiogeneseassoziiierter molekularer Marker beim Oropharynxkarzinom.



## **2. Einleitung**

### **2.1. Oropharynxkarzinom**

Mehr als 6% aller soliden Malignome sind Tumore im Kopf-Hals-Bereich und stehen somit an 6. Stelle aller Krebserkrankungen weltweit (Parkin, Bray et al. 2005). Die zweithäufigste Lokalisation im HNO-Bereich liegt nach dem Larynx im Oropharynx (Wiesmeth 2003). Zum Oropharynx gehören der Zungengrund, die Tonsillen, der weiche Gaumen und die hintere Pharynxwand. Am häufigsten sind die Tonsillen von Tumoren betroffen. Über 90% der Oropharynxneoplasien sind Plattenepithelkarzinome (Hermans 2005). Die Inzidenz für Oropharynxkarzinome wird mit 0,5-2 pro 100.000 Einwohner und Jahr angegeben. Männer erkranken drei- bis viermal so häufig wie Frauen mit einem Häufigkeitsgipfel im 6.-7. Lebensjahrzehnt (Canto and Devesa 2002; Parkin, Bray et al. 2005).

Für die Entstehung von Oropharynxkarzinomen gelten als Risikofaktoren Abusus von Tabak und Alkohol als gesichert (Epstein, Gorsky et al. 2008). Ein weiterer Risikofaktor ist ein früherer Tumor der oberen Luft- und Speisewege (Warnakulasuriya, Robinson et al. 2003). Der Gebrauch von Betelnüssen und Immunsuppression (infolge von Krankheiten oder Therapie) sind weitere beschriebene Risikofaktoren (Epstein, Gorsky et al. 2008). Ein ätiologischer Zusammenhang besteht weiterhin zwischen Oropharynxkarzinomen und einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) Typ 16 und weniger häufig mit dem HPV Typ 18. Bis zu 60% der Oropharynxkarzinome sind mit dem humanen HPV assoziiert (Wittekindt, Wagner et al. 2012). Die Inzidenz von Tonsillen- und Zungengrundtumoren in der Gruppe junger Erwachsener scheint in den letzten Jahren ansteigend zu sein (Shiboski, Schmidt et al. 2005).

Oropharynxkarzinome bleiben häufig lange symptomlos. Symptome wie Schmerzen im Halsbereich, Schluckbeschwerden, Halsschwellung, unerklärliche Ohrenscherzen können Anzeichen für einen Oropharynxtumor sein. Bei fortgeschrittenen Tumoren können Engegefühl, Kloßgefühl und Luftnot im Vordergrund stehen. Außerdem kann eine schmerzlose Schwellung der Halslymphknoten auf einen Tumor hinweisen (Hermans 2005).

Oropharynxkarzinome werden in Abhängigkeit von Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors und eventuell vorhandener Lymphknotenmetastasen behandelt. Als Behandlungsverfahren stehen neben der Operation die Radiotherapie und Chemotherapie sowie die Kombination der genannten Verfahren zur Verfügung (Walvekar, Li et al. 2008).

Für Oropharynxkarzinome erfolgt die Zuordnung zur T-Kategorie nach der aktuell gültigen TNM-Klassifikation (Wittekind 2010) anhand des Tumordurchmessers in seiner größten Ausdehnung wie folgt:

- T1 Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
- T2 Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 4cm in größter Ausdehnung
- T3 Tumor mehr als 4cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
- T4a Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hypoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer
- T4b Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, lateralen Nasopharynx, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Für die regionären Lymphknoten bei Oropharynxkarzinomen erfolgt die Einteilung nach der N-Kategorie:

- Nx Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Ipsilateral solitäre Lymphknotenmetastase  $\leq 3\text{cm}$
- N2 Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben:
  - N2a Lymphknotenmetastase ipsilateral solitär  $> 3\text{cm} - 6\text{cm}$
  - N2b Lymphknotenmetastasen ipsilateral multipel  $\leq 6\text{cm}$
  - N2c Lymphknotenmetastasen bilateral bzw. kontralateral  $\leq 6\text{cm}$
- N3 Lymphknotenmetastase(n)  $\geq 6\text{cm}$

Das Fehlen bzw. das Vorhandensein von Fernmetastasen gibt die M-Kategorie an. M0 bedeutet, dass es keinen Anhalt für Fernmetastasen gibt. M1 bedeutet, dass welche vorhanden sind.

Die komplexe TNM-Kategorisierung wird zur Beurteilung des Schweregrades der Tumorerkrankung in Tumorstadien eingeteilt:

Stadium 0	
Tis (in situ) N0M0	
Stadium I	
T1 N0 M0	
Stadium II	
T2 N0 M0	
Stadium III	
T3 N0 M0	
T1-3 N1 M0	
Stadium IV	
Stadium IVa	T1-3 N2 M0
	T4a N0-2 M0
Stadium IVb	T1-4 N3 M0
	T4b N0-3 M0
Stadium IVc	M1

Lokal nicht fortgeschrittene und nicht metastasierte Tumoren (T1 oder T2, N0M0) können operiert oder alternativ mittels Radiotherapie behandelt werden. Lokal fortgeschrittene und/oder metastasierte Tumoren werden kombiniert behandelt, das heißt, wenn es möglich ist operiert und mit einer postoperativen Radio- oder Radiochemotherapie sowie alternativ mittels definitiver Radio- oder Radiochemotherapie behandelt (Hermans 2005; Cignetti, Weber et al. 2008). Als Nebenwirkungen von sowohl Radio- als auch Radiochemotherapie sind Mundtrockenheit, Dysphagie, Knochennekrosen, Fibrosen und systemische Auswirkungen, wie Neuropathie, Knochenmarktoxizität, Niereninsuffizienz und Unfruchtbarkeit beschrieben (Walvekar, Li et al. 2008). Funktionelle Einschränkungen und ästhetische Einbußen können Auswirkungen einer chirurgischen Therapie sein. Das krankheitsspezifische 5-Jahres-Überleben für

Tumore der T1- und T2-Kategorie wird mit über 80% angegeben (Nguyen, Vos et al. 2007; Moncrieff, Sandilla et al. 2009). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt über allen Stadien insgesamt bei etwa 50%. Diese schlechte Überlebensrate liegt an der hohen Tendenz zur lymphogenen Metastasierung, der hohen Rezidivrate und am Auftreten von Zweittumoren. Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich in den letzten Jahren trotz der Weiterentwicklungen in der Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie nicht stark verändert (Epstein, Gorsky et al. 2008). Eine stagnierende Prognose sowie die erheblichen Nebenwirkungen der multimodalen Therapie geben bei dieser Tumorentität Anlass zur Suche nach neuen Therapieansätzen.

## **2.2. Physiologie und Pathologie der Angiogenese**

Während der frühen Embryonalentwicklung entstehen Blutgefäße durch Vaskulogenese, bei der sich Endothelzellen aus endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) entwickeln. Das so entstehende primitive vaskuläre System entwickelt sich durch Angiogenese zum Blutgefäßsystem des Kreislaufs. Angiogenese (aus dem griechischen „die Gefäßentstehung“) bezeichnet die Neubildung von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren) durch Aussprossung oder Teilung aus einem vorbestehenden Kapillarsystem. Diese Blutgefäße werden somit im Gegensatz zur Vaskulogenese aus bereits differenzierten Endothelzellen gebildet (Carmeliet 2000). Zu den wenigen physiologischen angiogenen Prozessen im adulten Gewebe gehören der weibliche Reproduktionszyklus, die Wundheilung und die Geweberegeneration. Von großer Bedeutung ist die Angiogenese bei zahlreichen pathologischen Prozessen, z.B. bei der diabetischen Retinopathie, bei der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis sowie bei Neoplasien (Pang and Poon 2006).

### **2.2.1. Tumorinduzierte Angiogenese**

Eine entscheidende Rolle spielen angiogene Prozesse bei der Tumorprogression und bei der hämatogenen Metastasierung. Schon 1971 stellte Judah Folkman die Hypothese auf, dass das Tumorstadium angiogeneseabhängig ist und die antiangiogene Therapie eine weitere potentielle Möglichkeit in der Tumorthherapie

darstellt. Ab einer Größe von wenigen Millimetern Durchmesser reicht die Diffusion nicht mehr aus, um wachsende solide Tumoren ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Um dennoch die Versorgung zu gewährleisten, benötigt der Tumor Anschluss an das Blutgefäßsystem (Folkman 1971; Folkman 1972).

Im Initialstadium von soliden Tumoren, in dem sie noch keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem haben, können Tumorzellen über Jahre in einer Art Ruhestadium verharren (Folkman 2003). Das Tumorwachstum wird in der Regel über ein Gleichgewicht aus proangiogenen und antiangiogenen Faktoren unterdrückt. Kommt es zu einer vermehrten Expression von proangiogenetischen Faktoren, kann es zum sogenannten „angiogenic switch“ kommen und die Neubildung von Blutgefäßen wird initiiert (Folkman 2003; Pang and Poon 2006). Erhält der Tumor Anschluss an das Blutgefäßsystem, kann es zur Tumorprogression und zur hämatogen Metastasierung kommen. Die Unterbindung der Angiogenese und somit des Tumorwachstums und der Metastasierung stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar. Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Schritten in der Signalkaskade bieten daher zahlreiche Angriffspunkte für eine antiangiogene Therapie (Carmeliet 2000).

### **2.3. Integrin-Rezeptoren**

Integrine gehören zur Familie der Zelloberflächenrezeptoren. Auf Grund ihrer Fähigkeit, Zellen mit anderen Zellen sowie mit der extrazellulären Matrix zu verbinden und ihnen damit zu einer Gewebestruktur zu verhelfen, zählt man Integrine zu den so genannten Adhäsionsmolekülen. Sie spielen somit eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, -migration und im Zellüberleben (Switala-Jelen, Dabrowska et al. 2004). Integrine und ihre Liganden haben verschiedenste Aufgaben in physiologischen und pathologischen Prozessen, z.B. in der Entwicklung von Geweben, bei der Leukozytenwanderung, bei bestimmten Schritten der Blutstillung sowie bei der Entstehung von Thrombosen, bei Entzündungen und verschiedenen Autoimmunkrankheiten, bei der Progression und Metastasierung von Tumoren und der Angiogenese (Hynes 2002; Switala-Jelen, Dabrowska et al. 2004). Integrine sind heterodimere Glykoproteine (gp), die

aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Gegenwärtig sind 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten und 24 Kombinationen aus beiden bekannt (Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008).

### 2.3.1. $\beta$ 3-Integrin-Rezeptor-Untereinheit

Das Vorkommen der  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit ist lediglich für zwei verschiedene Kombinationen beschrieben. Die  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit kann zum einen mit der  $\alpha$ IIb-Integrin-Untereinheit kombiniert sein und bildet so den Thrombozytenrezeptor gpIIb/IIIa. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 wird hauptsächlich auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert, wo sie eine Rolle in der physiologischen Thrombozytenadhäsion und -aggregation und in pathologischen thrombotischen Ereignissen spielen (Switala-Jelen, Dabrowska et al. 2004). Zum anderen kann die  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit mit der  $\alpha$ v-Integrin-Untereinheit assoziiert sein und bildet so den Vitronektin-Rezeptor. Dieser Rezeptor ist auf einer Vielzahl von Zellen v.a. aber auf aktivierten Endothelzellen zu finden, wo er eine wichtige Rolle in der Migration, Proliferation und Überleben dieser Zellen spielt. Die  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit besitzt somit eine putativ wichtige Funktion in der Entwicklung von Geweben, Angiogenese und Wundheilung (Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008). Diese Untereinheit des Integrin-Rezeptors ist somit bekanntermaßen in die Pathogenese zahlreicher Krankheiten involviert, beispielsweise Autoimmunkrankheiten, kardiovaskuläre Krankheiten, Transplantatabstoßungen und Tumorerkrankungen (Switala-Jelen, Dabrowska et al. 2004).

In verschiedenen humanen Tumorentitäten konnte eine verstärkte Expression der  $\beta$ 3-Integrin-Rezeptor-Untereinheit auf Tumorzellen und Gefäßendothelzellen nachgewiesen werden, wobei diese verstärkte Expression mit verschiedenen biologischen Eigenschaften der Tumoren korrelierte (Tabelle 1). Die  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit auf Tumorzellen trägt zusammengefasst möglicherweise zu Progression und Metastasierung humaner Tumoren durch eine Förderung von Migration, Invasion, Proliferation und zum Überleben der Tumorzellen bei (Desgrosellier and Cheresh 2010).

Tabelle 1: Studien zur Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und Progression humaner Tumoren

<b>Tumor/ Tumor in</b>	<b>Positive Korrelation mit</b>	<b>Nachweisverfahren</b>	<b>Quantifizierung</b>	<b>Quelle</b>
malignes Melanom	Tumordicke, Gefäßinvasion	Immunhistochemie (IHC), formalinfixierte Gewebeschnitte	semiquantitativ, 4-stufiger Score	(Bachmann, Ladstein et al. 2008)
Mamma	Knochenmetastasen	qRT-PCR	quantitativ	(Sloan, Pouliot et al. 2006)
Prostata	Knochenmetastasen	Mikro- Computertomographie, IHC, formalinfixierte Gewebeschnitte	quantitativ  keine Angabe	(McCabe, De et al. 2007)
Pankreas	Lymphknotenmetastasen	IHC, formalinfixierte Gewebeschnitte	semiquantitativer Score	(Hosotani, Kawaguchi et al. 2002)
Ovar	Invasion, Tumorstadium (variable Ergebnisse)	Maus-Modell	Reduktion der Tumorstadiumgröße	(Landen, Kim et al. 2008)
Cervix	reduziertem progressionsfreien Überleben, fernmetastasenfreien Überleben sowie krankheitsspezifischen Überleben	IHC, formalinfixierte Gewebeschnitte	semiquantitativ, 3-stufiger Score	(Gruber, Hess et al. 2005)
Glioblastom	Invasion, Tumorstadium	IHC, formalinfixierte Gewebeschnitte, Western Blott, RT-PCR	semiquantitativ, 4-stufiger Score, Densitometrie, qualitativ	(Schnell, Krebs et al. 2008)
Magen	Tumorstadiuminvasion, Gefäßinvasion, Lymphknoten- und Fernmetastasen	IHC, formalinfixierte Gewebeschnitte	semiquantitativ, 4-stufiger Score	(Chu, Ye et al. 2008)

### 2.3.2. Stand der Therapie mit Integrin-Inhibitoren

Einer der derzeit interessantesten und meistuntersuchtesten Integrin-Inhibitoren ist Cilengitide (Merck), ein zyklisches Pentapeptid. Er gilt als hoch potenter Inhibitor der tumorinduzierten Angiogenese, indem er durch Bindung an Integrin  $\alpha\beta 3$  und/oder  $\alpha\beta 5$  die Interaktion mit der extrazellulären Matrix inhibiert (Mas-Moruno, Rechenmacher et al. 2010). Aktuell wurde eine klinische Studie (Phase I/II) beendet, in der Cilengitide in Kombination mit Cisplatin, 5-Fluorouracil und Cetuximab bei rezidivierende und/oder metastasierenden Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich getestet wurde. Die zusätzliche Gabe von Cilengitide erbrachte keinen Vorteil (Vermorken, Peyrade et al. 2012).

### 2.4. VEGF-Rezeptor 2

Der VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR 2) gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird in Gefäßendothelzellen exprimiert. Er ist hochaffin für einige Mitglieder der VEGF-Familie u.a. VEGF-A, -C, -D und E. VEGFR 2 ist als der essentielle Rezeptor für die Übermittlung der Effekte des VEGF-A in der embryonalen Gefäßentwicklung und in der physiologischen und pathologischen Angiogenese im Adulten bekannt. VEGF und VEGFR 2 spielen an Endothelzellen eine Rolle bei der physiologischen Angiogenese, z.B. beim Reproduktionszyklus und bei der Wundheilung. Während der pathologischen Angiogenese, wie z.B. bei der diabetischen Retinopathie und der Tumorentwicklung wurde eine Hochregulation von VEGF und VEGFR 2 beschrieben (Karkkainen and Petrova 2000; Shibuya 2006).

VEGF und VEGFR 2 wird in der Angiogenese von soliden Tumoren eine Schlüsselrolle zugesprochen. VEGF übermittelt durch die Stimulation von VEGFR 2 und den damit aktivierten Signalkaskaden Endothelzellproliferation, -migration, Endothelzellüberleben, Lumenformation und Gefäßpermeabilität (Shibuya 2003; Holmes, Roberts et al. 2007). Angiogenese ist mitentscheidend für Wachstum, Invasivität und Metastasierung von Tumoren (Pang and Poon 2006). Der Zusammenhang zwischen der Expression von VEGF/VEGFR und der Vaskularisation solider Tumoren konnte in einer Vielzahl verschiedener Tumoren



beispielsweise durch in-situ Hybridisierung und IHC gezeigt werden (Veikkola, Karkkainen et al. 2000). Antikörper gegen VEGFR 2 zeigten suppressive Effekte im Wachstum solider Tumoren in Mäusen (Shibuya 2003).

Bei Melanomen, Ovarial- und Pankreaskarzinomen (Masood, Cai et al. 2001), Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (Lalla, Boisoneau et al. 2003; Neuchrist, Erovic et al. 2003) und bei kolorektalen Tumoren (Giatromanolaki, Koukourakis et al. 2007) konnte nicht nur eine VEGF- sondern auch eine VEGFR 2-Expression in humanen Tumorzellen gezeigt werden. Das Vorhandensein von VEGFR 2 auf diesen Tumorzellen deutete dabei auf eine autokrine regulatorische Funktion von VEGF beim Tumorwachstum hin. Dies ergänzt möglicherweise angiogene Effekte von VEGF/VEGFR 2 an Endothelzellen. Die Inhibition von VEGF und/oder VEGFR 2 führte in-vitro zu reduzierter Proliferation von Melanom-, Ovarialkarzinom- und Prostatakarzinomzelllinien (Masood, Cai et al. 2001) sowie von Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereiches (Lalla, Boisoneau et al. 2003).

#### 2.4.1. Stand der Therapie mit VEGF-Rezeptor 2-Inhibitoren

Aufgrund der Schlüsselrolle des VEGFR 2 sind zahlreiche Inhibitoren in der Entwicklung bzw. in der klinischen Prüfung. Zwei derzeit zugelassene niedermolekulare Multi-Kinase-Inhibitoren, die u.a. VEGFR 2 blockieren, sind das Sorafenib (Nexavar® Onyx/Bayer) und das Sunitinib (Sutent® Pfizer). Sorafenib hat die Zulassung zur Behandlung von hepatozellulären Karzinomen und von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen, bei denen die Therapie mit Interferon  $\alpha$  bzw. Interleukin-2 versagt hat oder nicht geeignet ist. Beide Substanzen sind bislang bei Kopf-Hals-Tumoren nicht zur Anwendung gekommen. Sorafenib zeigt sowohl antiproliferative als auch antiangiogene Eigenschaften. Eine Erhöhung der progressionsfreien Überlebensdauer konnte bei der Behandlung von Nierenzellkarzinomen (Kane, Farrell et al. 2006) und eine Erhöhung der Gesamtüberlebenszeit bei der Behandlung von hepatocellulären Karzinomen (Llovet, Ricci et al. 2008) gezeigt werden. Sunitinib wird zur Behandlung von nicht-resezierbaren und/oder metastasierten gastrointestinalen Stromatumoren verwendet, wenn Resistenzen oder Unverträglichkeiten gegenüber Imatinib

(Glivec®, Novartis) aufgetreten sind. Weiterhin wird es zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms eingesetzt (Faivre, Demetri et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die progressionsfreie Überlebenszeit unter der Behandlung mit Sunitinib erhöht war (Demetri, van Oosterom et al. 2006; Motzer, Hutson et al. 2007). Ein weiteres wirksames Medikament, welches in das VEGF/VEGFR 2 System eingreift, ist Bevacizumab (Avastin®, Genentech). Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Antikörper (AK), der die Bindung von VEGF an VEGFR 1 und 2 hemmt. Bevacizumab wird u.a. in Kombination mit Chemotherapeutika zur Behandlung von metastasierten Karzinomen des Kolons, des Rektums und der Brust angewandt, sowie bei fortgeschrittenen, metastasierten oder rezidivierenden nicht resezierbaren nicht-kleinzelligen Lungentumoren und bei fortgeschrittenen oder metastasierten Nierentumoren in Kombination mit Interferon  $\alpha 2a$  angewendet (Eichholz, Merchant et al. 2010). Bevacizumab ist in der Kombination mit Cetuximab nach aktuellen Phase II-Studien-Daten bei rezidivierendem Kopf-Hals-Tumor als auch in Kombination mit Radiotherapie bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren in der Primärtherapie wirksam (Argiris, Kotsakis et al. 2012; Fury, Lee et al. 2012). Eine Vielzahl von weiteren Antikörpern und niedermolekularen Molekülen sind derzeit in der Entwicklung oder in der klinischen Erprobung.

### **3. Ziele der Arbeit**

Die Prognose von Oropharynxkarzinomen ist trotz der Einführung multimodaler Therapiekonzepte unverändert schlecht. Neoangiogenese spielt bei der Pathogenese solider Tumoren eine wichtige Rolle, ist beim Oropharynxkarzinom jedoch nur unzureichend erforscht. Insbesondere fehlt es am Verständnis einer klinischen Relevanz bekannter Angiogenesefaktoren in vivo. Deshalb sind Kenntnisse über die Expression dieser Faktoren beim Oropharynxkarzinom für die Erprobung und Entwicklung einer hiergegen zielgerichteten Therapie unerlässlich.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Expression einer Integrin-Rezeptor-Untereinheit, die bei humanen Tumoren häufig beschrieben wurde, die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit, und die Expression eines Schlüsselmoleküls der physiologischen und pathologischen Angiogenese, der VEGF-Rezeptor 2 in Proben humaner Oropharynxkarzinome immunhistochemisch untersucht. Für die Probenauswahl wurden aus einem großen Kollektiv Primärtumoren der Kategorie T1-2 und falls vorhanden, zugehörige Lymphknotenmetastasen ausgewählt. Hierdurch sollte einerseits ein möglicher Zusammenhang zwischen Proteinexpression und Tumorprogression sowie frühe Metastasierung herausgearbeitet werden. Deswegen wurden fortgeschrittene Tumoren (T3-4) nicht eingeschlossen. Das onkologische Outcome der Patienten wurde gleichfalls aus den Akten und der Tumordokumentation ermittelt. Hierdurch sollte weiterhin ein möglicher Zusammenhang zwischen Proteinexpression und der Prognose der Patienten festgestellt werden.

## 4. Patientendaten, Material und Methoden

### 4.1. Patientendaten

Die Patientendaten wurden aus einer SPSS-Datei extrahiert, die vom Tumorzentrum Jena zur Verfügung gestellt wurde. Der Auszug aus der elektronischen Datenbank des Tumorzentrums umfasste die Jahre 1996 bis 2006 mit initial 28170 registrierten und im Universitätsklinikum Jena behandelten Tumoren (Stand 31.12.2006).

Aus der Datenbank wurden nach folgendem Suchalgorithmus die Tumorfälle ausgewählt:

Tumorlokalisation:	Oropharynx
Tumorhistologie:	Plattenepithelkarzinom
pT-Kategorie:	T1 oder T2
pN-Kategorie:	N0 oder N+
Erstdiagnose/Operationsjahr:	1996 bis 2005

Das Patientenkollektiv bestand hiernach aus 68 Patienten und aus der Datenbank des Tumorzentrums wurden anschließend folgende Daten extrahiert:

Name  
Vorname  
Alter  
Geschlecht  
pT-Kategorie  
pN-Kategorie  
Operationsjahr  
Datum eines Tumorrezidives  
Datum der letzten Follow-up Untersuchung  
Sterbedatum

In einem dritten Schritt wurden aus den Patientenakten des Archivs der HNO-Klinik und der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Jena folgenden Daten erfasst:

Datum eines Tumorrezidives (Stand Juni 2009)

Datum der letzten Follow-up Untersuchung (Stand Juni 2009)

Strahlentherapie erfolgt: ja/nein

Sterbedatum (Stand Juni 2009)

Eingangsnummern der Tumorgewebe des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Jena

Anschließend erfolgte die Auswahl der Gewebeproben anhand der Eingangsnummern. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Jena herausgesucht. Anhand einer Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE) wurden die für die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen geeigneten Gewebeproben festgelegt. Dabei waren die Tumorhistologie und eine repräsentative Größe des Tumorgewebes entscheidend. Das letztendlich verwendete Patientenkollektiv bestand hiernach aus 46 Patienten und setzte sich aus 32 Männern und 14 Frauen im Alter von 39 bis 76 Jahren (Mittelwert 57,5 Jahre, Median 57 Jahre) zusammen.

## **4.2. Material**

### **4.2.1. Primärantikörper**

#### **Antikörper**

#### **Hersteller**

##### **1. Anti-humaner Integrin $\beta 3$**

monoklonaler Maus-Antikörper

Abcam, Cambridge, England

##### **2. Anti-humaner VEGFR 2**

monoklonaler Kaninchen-Antikörper

Cell Signaling Technology,  
Boston, USA

#### 4.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Antikörperversdünung	Dako, Hamburg
Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (K5005)	Dako, Hamburg
Dual Endogenous Enzyme Block (DEEB)	Dako, Hamburg
EDTA-Puffer pH 9,0	Dako, Hamburg
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%, 96%, 100%	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin-Lösung (nach Mayer)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Waschpuffer	Dako, Hamburg
Xylol	Merck, Darmstadt

#### 4.2.3. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dampfgarer (MultiGourmet)	Braun, Kronberg/Taunus
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Färbeautomat (Dako Autostainer Plus)	Dako, Hamburg
Feuchtkammer	Eigenbau Pathologie Jena
Mikroskop (Leica DM2500)	Leica, Wetzlar
Mikroskop- Kamera (Nikon DS-Fi1)	Nikon, Düsseldorf
Mikrotom	Leica, Nussloch
Objektträger (SuperFrost Plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reagenzgefäße 12ml	Dako, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Eppendorf, Hamburg

### 4.3. Methoden

#### 4.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der HE-Färbung stellen sich basophile Bestandteile wie Zellkerne blau, azidophile Bestandteile wie das Zytoplasma oder Kollagenfasern rot dar. Die in Paraffin eingebetteten Präparate wurden mit dem Mikrotom in 6 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Vor der Färbung mussten die Paraffinschnitte rehydriert werden:

- Brutschrank bei 60°C 30 min
- Xylol 2 x 10 min
- 100 % Ethanol 3 x 2 min
- 96% Ethanol 3 x 2 min
- 70% Ethanol 3 x 2 min
- Destilliertes Wasser 1 x 5 min

Danach erfolgte die Färbung mit Eosin und Hämatoxylin:

- Hämatoxylin 1 x 2 min
- Destilliertes Wasser 2 x 1 min
- Bläuen in warmem Wasser 1 x 5 min
- Destilliertes Wasser 2 x 1 min
- Eosin 1 x 30 sec
- Destilliertes Wasser 1 x 2 min

Es schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol an:

- 70% Ethanol 2 x spülen
- 96% Ethanol 2 x spülen
- 90% Ethanol 2 x spülen
- Xylol 2 x spülen

Danach wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläschen eingedeckt.

#### 4.3.2. Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren dienen dem Nachweis und der Lokalisation von Antigenen in Geweben. Das gesuchte Antigen wird mit einem Primärantikörper (PAK) markiert und dessen Bindung sichtbar gemacht. Bei der hier durchgeführten Färbung wurde die Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) angewandt. Nachdem sich der spezifische PAK an das gesuchte Antigen gebunden hat, wird ein biotinylierter Sekundärantikörper (SAK) hinzugegeben, welcher sich wiederum an den PAK bindet. Im nächsten Schritt werden die mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidinmoleküle hinzugefügt. Jedes biotinylierte Antikörpermolekül kann mit mehreren solcher Streptavidinmolekülen reagieren, was die Empfindlichkeit des Detektionssystems erhöht. Die alkalische Phosphatase – und damit auch das entsprechende Antigen – wird mit Chromogen sichtbar gemacht. Bei dem hier verwendeten Chromogen handelt es sich um ein Chromogen Fast Red, welches zu einem roten Endprodukt am Ort des Zielantigens führt. Da die alkalische Phosphatase auch endogen im Gewebe vorkommt und das Substratchromogen diese nicht von der antikörpergebundenen alkalischen Phosphatase unterscheiden kann, muss die Aktivität des endogenen Enzyms vor der immunhistochemischen Färbung blockiert werden, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden.

#### 4.3.3. Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Nach dem Schneiden und Rehydrieren (siehe 4.3.1) wurden die Schnitte für die Antigendemaskierung in EDTA-Puffer pH 9,0 für 20 min bei 100°C im Dampfgerar inkubiert und danach für 20 min bei Raumtemperatur in dieser Lösung abgekühlt. Es folgte ein 5-minütiger Waschvorgang im Waschpuffer. Um die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren, wurden die Schnitte 10 min mit Dual Endogenous Enzyme Block (DEEB) behandelt. Nach 3-maligem Spülen im Waschpuffer waren die Schnitte für die eigentliche Färbung vorbereitet, welche nach folgenden Protokollen erfolgte:



1. anti-Integrin  $\beta$ 3-AK (die Färbung erfolgte mit Hilfe eines Färbeautomaten)

- 30 min Inkubation mit anti-Integrin  $\beta$ 3-AK 1:100 verdünnt in Antikörperversdünnung
- Spülen mit Waschpuffer
- 15 min Inkubation mit dem SAK
- Spülen mit Waschpuffer
- 15 min Inkubation mit dem, mit alkalischer Phosphatase konjugiertem, Streptavidin
- Spülen mit Waschpuffer
- 2 x 5 min Inkubation mit Chromogen Red

Nach der Entnahme der Schnitte aus dem Automaten folgte das Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser für etwa 5 Minuten.

2. anti-VEGFR 2-AK

- Inkubation mit anti-VEGFR 2-AK 1:400 verdünnt mit Antikörperversdünnung bei 4°C über Nacht in der Feuchtkammer
- 3 x 5 min spülen mit Waschpuffer
- 30 min Inkubation mit dem SAK
- 3 x 5 min spülen mit Waschpuffer
- 30 min Inkubation mit dem, mit alkalischer Phosphatase konjugiertem, Streptavidin
- 3 x 5 min spülen mit Waschpuffer
- 7 min Inkubation mit Chromogen Red
- Spülen mit destilliertem Wasser

Die Gegenfärbung erfolgte für alle Schnitte mit Hämatoxylin für etwa 30 sec. Anschließend wurde 2 x mit destilliertem Wasser gespült und die Schnitte für 3 min mit warmem Leitungswasser gebläut. Nach Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe bis zum Xylol wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläschen eingedeckt.

Die Probefärbungen zur Erarbeitung des immunhistochemischen Färbeprotokolls des anti-Integrin  $\beta 3$ -AK wurden an Schnitten von Glioblastomen durchgeführt. An Schnitten von Glioblastomen erfolgte auch die Positivkontrolle und Negativkontrolle. Des Weiteren erfolgte die immunhistochemische Färbung zweier gesunder Tonsillen mit dem fertigen immunhistochemischen Färbeprotokoll.

Die Probefärbungen zur Erarbeitung des immunhistochemischen Färbeprotokolls des anti-VEGFR 2-AK erfolgte direkt an Schnitten von Oropharynxkarzinomen. Auch hier erfolgte eine immunhistochemische Färbung zweier gesunder Tonsillen.

#### 4.3.4. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die histomorphologische Beurteilung der 46 Primärtumoren und der 27 Lymphknotenmetastasen erfolgte, wie auch die Auswertung der dazugehörigen immunhistochemischen Präparate, durch Analyse von 5 Gesichtsfeldern mit 400-facher Vergrößerung (High-power field, HPF) pro Schnitt. Die Auswertung erfolgte ohne Kenntnis der klinischen Begleitdaten semiquantitativ.

Für die Auswertung der immunhistologischen Färbung wurden bei den mit anti-VEGFR 2-AK gefärbten Schnitten die Farbintensität der Gefäßendothelzellen und der Tumorzellen ausgewertet. Bei den mit anti-Integrin  $\beta 3$ -AK gefärbten Schnitten wurde die Farbintensität der Tumorzellen und der Entzündungszellen ausgewertet. Sie wurden jeweils den Kategorien schwach und stark reaktiv zugeordnet. Ausgewählte Präparate sind zur Dokumentation fotografiert worden.

#### 4.3.5. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die Statistiksoftware SPSS, Version 15.0, verwendet. Die deskriptive Statistik (Mittelwert, Standardabweichung und Median) wurde genutzt, um die Verteilung der Merkmale von Patienten, Tumoren, Metastasen und Färbereaktionen der AK aufzuzeigen. Um die Zusammenhänge zwischen den Färbereaktionen mit der Tumorgroße und der Metastasierung zu evaluieren, ist ein nicht-parametrisches Testverfahren (Mann-Whitney-U-Test) angewendet worden. Als onkologische Endpunkte wurden Gesamtüberleben und

rezidivfreies Überleben verwendet. Die Gesamtüberlebenszeit wurde als Zeit zwischen dem Operationstag und dem Tod bzw. dem Ausscheiden aus der Nachsorge (overall survival, OS), die rezidivfreie Überlebenszeit (recurrence-free survival, RFS) als Zeit zwischen dem Operationstag und dem Auftreten eines Tumorrezidives bzw. dem Ausscheiden aus der Nachsorge festgelegt. Das Überleben wurde mit der Kaplan-Meier Methode geschätzt. Zum Vergleich von Überlebensschätzkurven ist der log-rank Test angewendet worden. Das Signifikanzniveau aller Tests wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Biometrische Daten

In die Untersuchung wurden 46 Patienten einbezogen, 32 Männer und 14 Frauen im Alter von durchschnittlich 57,5 Jahren ( $\pm 9,6$  Jahre). Davon hatten 15 Patienten einen Primärtumor in T1-, und 31 Patienten einen Tumor in T2-Kategorie. Bei 27 der 46 (58,7%) Patienten bestanden Lymphknotenmetastasen. Bei 35 der 46 (76,1%) Patienten wurde postoperativ eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt. Neben den 27 Patienten mit Lymphknotenmetastasen wurden 8 weitere aufgrund knapper Resektionsränder der postoperativen Strahlentherapie zugeführt (Tabelle 2). In 7 Fällen war nach der initialen Therapie im weiteren Nachbeobachtungszeitraum ein Tumorrezidiv dokumentiert. Fünf dieser Rezidive traten innerhalb der ersten 2 Jahre auf, ein weiteres in den folgenden 3 Jahren. Bei einem Patienten trat das Rezidiv erst mehr als 6 Jahre nach der primären Tumoresektion auf. Die mediane Nachbeobachtungszeit (mediane Überlebenszeit) aller Patienten betrug 70,9 Monate. Innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums sind 10 der 46 Patienten (21,7%) verstorben. Die mediane Nachbeobachtungszeit aller noch lebenden Patienten betrug 76,2 Monate.

Tabelle 2: Biometrische Daten von Patienten mit Oropharynxkarzinom (n=46)

T-Kategorie	n	%
T1	15	32,6
T2	31	67,4
N-Kategorie		
N0	19	41,3
N+	27	58,7
Lokoregionäres Tumorrezidiv		
ja	7	15,2
nein	39	84,8
Geschlecht		
männlich	32	69,6
weiblich	14	30,4
Alter (MW 57,5 Jahre)		
30-39 J.	1	2,2
40-49 J.	9	19,6
50-59 J.	16	34,8
60-69 J.	14	30,4
70-79 J.	6	13,4
OP-Jahr		
1996	5	10,9
1997	2	4,3
1998	4	8,7
1999	6	13,0
2000	6	13,0
2001	4	8,7
2002	2	4,3
2003	6	13,0
2004	8	17,4
2005	3	6,5
Strahlentherapie erfolgt		
ja	35	76,1
nein	11	23,9
Mediane Überlebenszeit	70,9 Monate	

---

## 5.2. Onkologisches Outcome

Für das OS ergaben sich folgende Werte: nach 2 Jahren lebten 93,3 % der Patienten mit einem Tumor der T1-Kategorie und nach 5 Jahren waren es noch 60%. Bei den Patienten mit einem Tumor der T2-Kategorie lebten nach 2 Jahren 96,8%, nach 5 Jahren 67,7% (log rank-Test  $p=0,974$ ; Abbildung 1 und Tabelle 3). Von allen Patienten mit einer N0-Kategorie lebten nach 2 Jahren 94,7%, nach 5 Jahren 63,2%. Von den Patienten mit einer N+-Kategorie lebten nach 2 Jahren noch 96,3% und nach 5 Jahren 66,7% (log rank-Test  $p=0,153$ ; Abbildung 3 und Tabelle 3). Für das RFS ergaben sich folgende Werte: nach 2 Jahren waren 86,7% der Patienten mit einem Tumor der T1-Kategorie rezidivfrei, nach 5 Jahren waren es noch 80%. Bei den Patienten mit einem Tumor der T2-Kategorie waren sowohl nach 2 als auch nach 5 Jahren 90,3% rezidivfrei (log rank-Test  $p=0,909$ ; Abbildung 2 und Tabelle 3). Von allen Patienten mit N0-Kategorie waren nach 2 Jahren 89,5% und nach 5 Jahren 84,2% rezidivfrei. Bei denen mit N+-Kategorie waren sowohl nach 2 als auch nach 5 Jahren 88,9% rezidivfrei (log rank  $p=0,093$ ; Abbildung 4 und Tabelle 3). Im log rank-Test ergaben sich zusammengefasst Hinweise dafür, dass in dem hier untersuchten Patientenkollektiv kein signifikanter Unterschied zwischen dem OS bzw. dem RFS und der T- bzw. N-Kategorien bestand (Tabelle 3 und Abbildungen 1 bis 4). Es ergab sich ein Trend für eine verbesserte lokoregionäre Tumorkontrolle (88,9% vs. 84,2% RFS nach 5 Jahren bei N+ vs. N0) bei Patienten, die N+ klassifiziert waren.

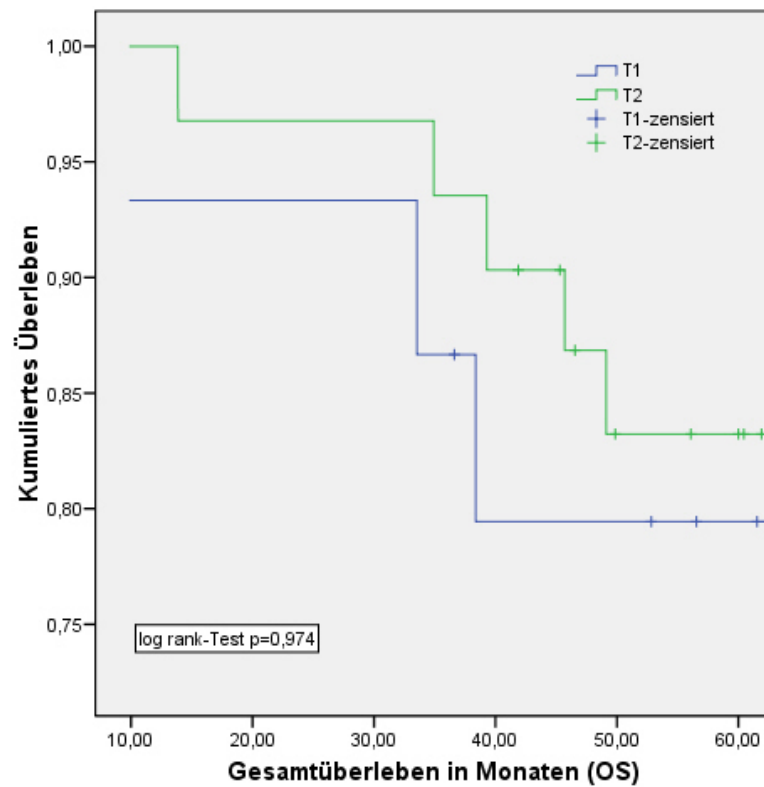


Abbildung 1: OS von Patienten mit Tumoren der T1- und T2-Kategorie

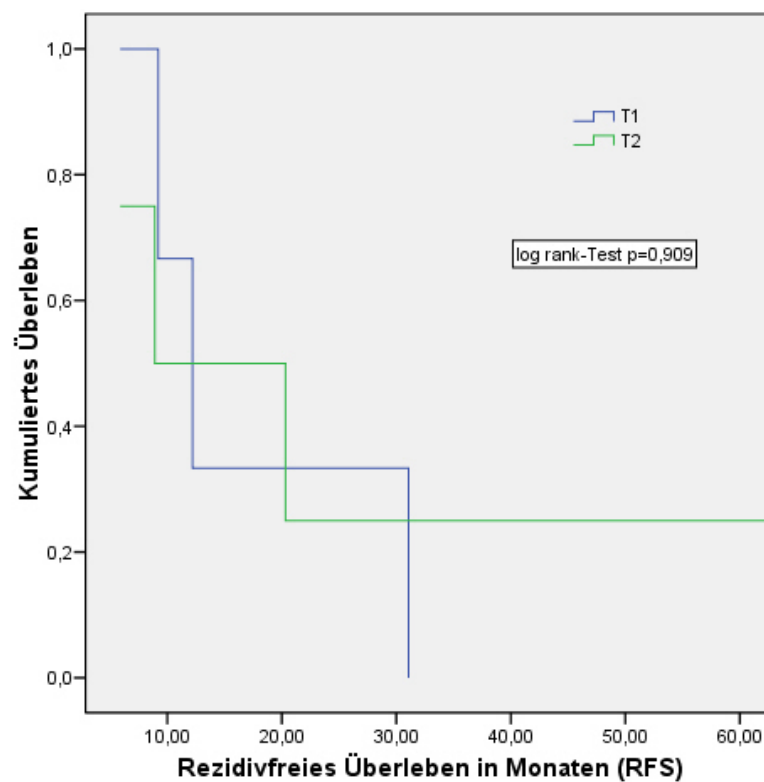


Abbildung 2: RFS von Patienten mit Tumoren der T1- und T2-Kategorie

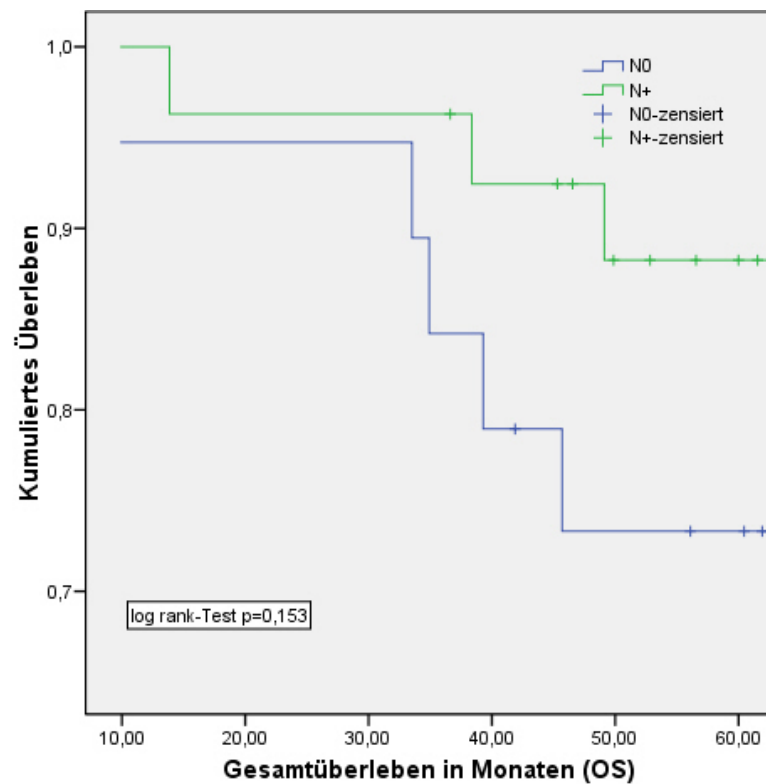


Abbildung 3: OS von Patienten mit Tumoren der N0- und N+-Kategorie

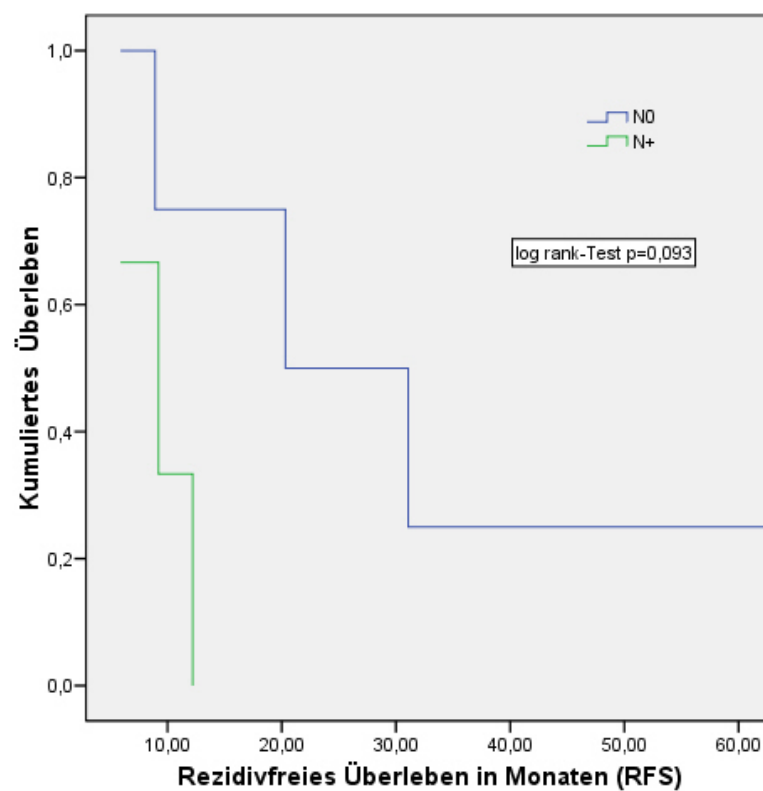


Abbildung 4: RFS von Patienten mit Tumoren der N0- und N+-Kategorie



Tabelle 3: Onkologisches Outcome

**OS**

		2-Jahre		5-Jahre		p-Wert*
T-Kategorie		n	%	n	%	
	T1	14	93,3	9	60	0,974
	T2	30	96,8	21	67,7	
N-Kategorie						
	N0	18	94,7	12	63,2	0,153
	N+	26	96,3	18	66,7	

**RFS**

		2-Jahre		5-Jahre		
T-Kategorie						
	T1	13	86,7	12	80	0,909
	T2	28	90,3	28	90,3	
N-Kategorie						
	N0	17	89,5	16	84,2	0,093
	N+	24	88,9	24	88,9	

\*log rank-Test, OS: overall survival, RFS: recurrence-free survival

### 5.3. Ergebnisse der Immunhistochemie

Zur Überprüfung, ob die älteren Präparate generell eine altersbedingt schwächere Färbereaktion zeigen, wurden sie anhand des Operationsjahres in zwei Gruppen unterteilt. In der einen Gruppe wurden alle Präparate der Jahre 1996 bis 2000 und in der zweiten Gruppe alle Präparate der Jahre 2001 bis 2005 zusammengefasst. Der Zusammenhang zwischen dem Alter der Schnitte und der Färbeintensität wurden mit Hilfe eines nicht-parametrischen Testverfahrens (Mann-Whitney-U-Test) untersucht. So konnte eine systematische Beeinflussung der Intensität der Färbereaktionen aufgrund der Liegedauer der Tumorproben ausgeschlossen werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Untersuchung auf systematischen Fehler hinsichtlich der Liegedauer formalinfixierter und eingebetteter Tumorproben und der Intensität der immunhistochemischen Färbereaktionen

		Alte Präparate	Neue Präparate	p-Wert*
<b>Primärtumor mit anti-VEGFR 2-AK gefärbt</b>				
Gefäßendothel	stark reaktiv	16/23 (69,57%)	13/23 (56,52%)	0,542
Tumorzellen	stark reaktiv	11/23 (47,83%)	2/23 (8,7%)	0,007
<b>Lymphknotenmetastasen mit anti-VEGFR 2-AK gefärbt</b>				
Gefäßendothel	stark reaktiv	13/14 (92,86%)	8/13 (61,54%)	0,077
Tumorzellen	stark reaktiv	7/14 (50,00%)	3/13 (23,08%)	0,236
<b>Primärtumor mit anti-Integrin <math>\beta</math>3-AK gefärbt</b>				
Tumorzellen	stark reaktiv	6/23 (26,09%)	8/23 (34,78%)	0,749
Entzündungszellen	stark reaktiv	8/23 (34,78%)	14/23 (60,87%)	0,139
<b>Lymphknotenmetastasen mit anti-Integrin <math>\beta</math>3-AK gefärbt</b>				
Tumorzellen	stark reaktiv	0/14 (0,00%)	2/13 (15,38%)	0,222
Entzündungszellen im LK	stark reaktiv	1/14 (7,14%)	1/13 (7,69%)	1
Paranodale Entzündungszellen	stark reaktiv	3/14 (21,43%)	2/13 (15,38%)	1

\*Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, 2-seitig; Alte Präparate= Operationsjahr 1996-2000; Neue Präparate= Operationsjahr 2001-2005

### 5.3.1. Ergebnisse der $\beta$ 3-Integrin-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung mit dem anti-Integrin  $\beta$ 3-AK wurde an Schnitten der 46 Primärtumoren und an den dazugehörigen 27 Schnitten von Lymphknotenmetastasen durchgeführt. Bei der Durchsicht dieser Schnitte zeigten Tumorzellen und Entzündungszellen deutliche Färbereaktionen, weshalb diese zur weiteren Auswertung der immunhistochemischen Färbung herangezogen wurden. Die Färbereaktion der Zellen ließ sich in 2 Kategorien einteilen: schwach reaktiv und stark reaktiv (Abbildungen 5 und 6). Die Färbereaktion der Tumor- und Entzündungszellen wurde anschließend mit den T- und N-Kategorien korreliert, ohne dass sich ein signifikanter Zusammenhang ergab (Tabelle 5).

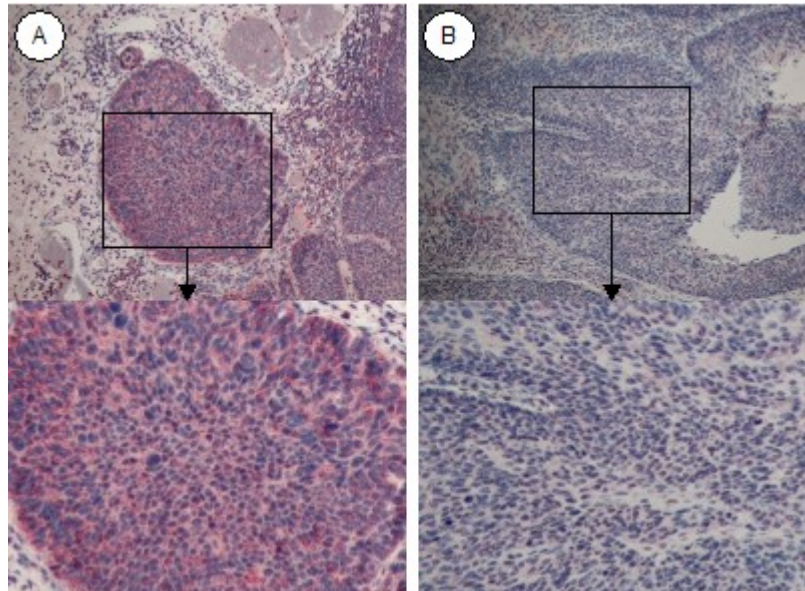


Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung von Oropharynxkarzinomschnitten mit anti-Integrin  $\beta 3$ -AK:  
A)starke Färbereaktion der Tumorzellen (x50, x200)  
B)schwache Färbereaktion der Tumorzellen (x50, x200)

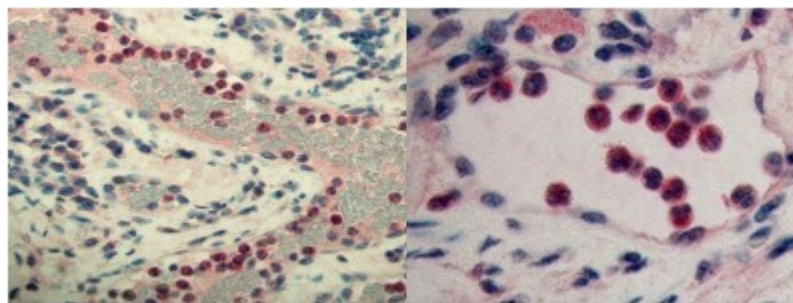


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung von Oropharynxkarzinomschnitten mit anti-Integrin  $\beta 3$ -AK:  
starke Färbereaktion von Entzündungszellen (x200, x400)

Tabelle 5: Ergebnisse der  $\beta$ 3-Integrin-IHC

<u>Primärtumor</u>				
	T1	T2	N0	N+
<b>Tumorzellen</b>				
schwach reaktiv	8	24	13	19
stark reaktiv	7	7	6	8
p-Wert*	0,170		1.0	
<b>Entzündungszellen</b>				
schwach reaktiv	10	14	8	16
stark reaktiv	5	17	11	11
p-Wert*	0,217		0,370	
 <u>Lymphknotenmetastase</u>				
<b>Tumorzellen</b>				
schwach reaktiv	9	16	25	
stark reaktiv	2	0	2	
p-Wert*	0,157			
<b>Entzündungszellen im Lymphknoten</b>				
schwach reaktiv	11	14	25	
stark reaktiv	0	2	2	
p-Wert*	0,499			
<b>Paranodale Entzündungszellen</b>				
schwach reaktiv	9	13	22	
stark reaktiv	2	3	5	
p-Wert*	1.0			

\*Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, 2-seitig

### 5.3.2. Ergebnisse der VEGF-Rezeptor 2-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung mit dem anti-VEGFR 2-AK wurde an Schnitten der 46 Primärtumoren und an den dazugehörigen 27 Schnitten von Lymphknotenmetastasen durchgeführt. Bei der Durchsicht dieser Schnitte zeigten Gefäßendothelien und Tumorzellen deutliche Färbereaktionen, weshalb diese zur weiteren Auswertung der immunhistochemischen Färbung herangezogen wurden.

Die Färbereaktion der Zellen ließ sich in 2 Kategorien einteilen: schwach reaktiv und stark reaktiv (Abbildung 7 und 8). Die Färbereaktion der Gefäßendothelien und Tumorzellen wurde anschließend mit den T- und N-Kategorien korreliert. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (Tabelle 6).

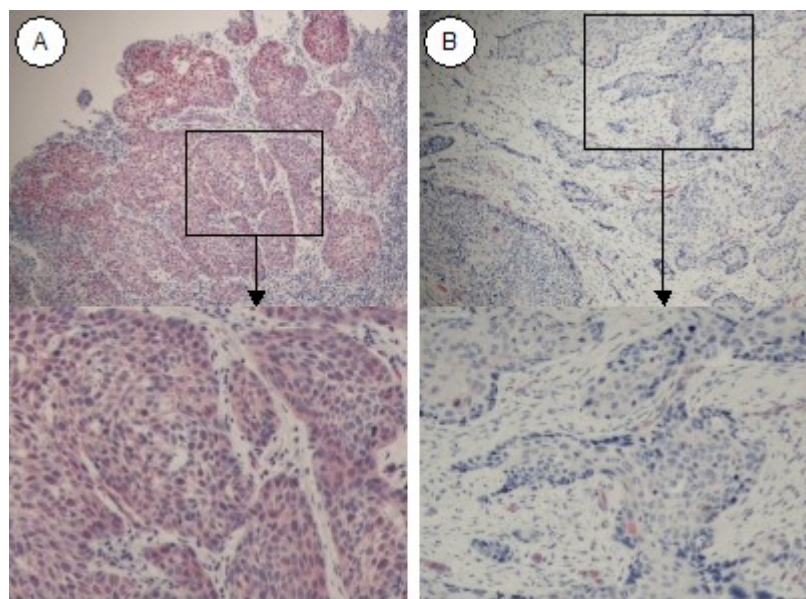


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung von Oropharynxkarzinomschnitten mit anti-VEGFR 2-AK:  
A)starke Färbereaktion der Tumorzellen (x50, x200)  
B)schwache Färbereaktion der Tumorzellen (x50, x200)

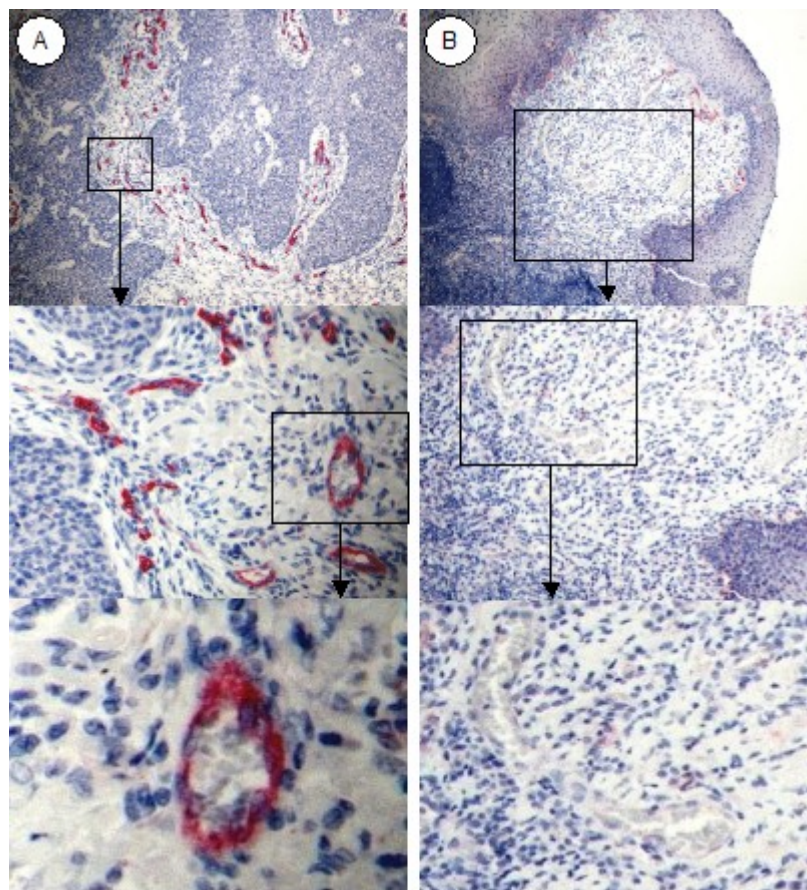


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung von Oropharynxkarzinomschnitten mit anti-VEGFR 2-AK: A)starke Färbereaktion des Gefäßendothels (x50, x200, x400) B)schwache Färbereaktion des Gefäßendothels (x50, x100, x200)

Tabelle 6: Ergebnisse der VEGFR 2-IHC

<u>Primärtumor</u>				
	T1	T2	N0	N+
<b>Gefäßendothel</b>				
schwach reaktiv	6	11	5	12
stark reaktiv	9	20	14	15
p-Wert*	1,000		0,235	
<b>Tumorzellen</b>				
schwach reaktiv	10	23	14	19
stark reaktiv	5	8	5	8
p-Wert*	0,730		1,000	
<u>Lymphknotenmetastase</u>				
<b>Gefäßendothel</b>				
schwach reaktiv	3	3		6
stark reaktiv	8	13		21
p-Wert*	0,662			
<b>Tumorzellen</b>				
schwach reaktiv	6	11		17
stark reaktiv	5	5		10
p-Wert*	0,687			

\*Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, 2-seitig

## 5.4. Prognose

Nach Analyse prognoserelevanter biometrischer Merkmale zur Überprüfung der Homogenität der Patientenproben war auffällig, dass als einziges biometrisches Merkmal ein lang zurückliegendes Operationsdatum mit einem signifikant besseren Überleben der Patienten verknüpft war. Aufgrund der durchschnittlich längeren Nachbeobachtungszeit bei Patienten, die in den Jahren von 1996 bis 2000 operiert wurden, ergab sich ein längeres Überleben dieser Patientengruppe (MW 85,5±34,4 Monate) im Vergleich zu der Patientengruppe mit einer Operation zwischen 2001 bis 2005 (MW 60,2±21,2 Monate, Mann-Whitney-U-Test p=0,005; Tabelle 7).



Tabelle 7: Operationsjahr und Überleben

**Gesamtüberleben in Monaten von Patienten mit der**

	OP zwischen 1996 und 2000 n=23	OP zwischen 2001 und 2005 n=23
Mittelwert	85,5	60,2
Standardabweichung	34,4	21,2
Median	90,35	60
p-Wert*	0,005	

\*Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, 2-seitig

Anschließend wurden die Patienten zur Korrelation von Färbereaktionen und Prognose anhand des Medians des OS (70,9 Monate  $\pm$  31,0 Monate) in zwei Gruppen eingeteilt. Die Färbeergergebnisse der beiden AK wurden mit diesen beiden Gruppen korreliert. Dabei zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Median des OS und der Färbereaktion der mit anti-Integrin  $\beta$ 3-AK gefärbten Tumorzellen (Mann-Whitney-U-test  $p=0,023$ ). Bei den Patienten, die länger als 70,9 Monate überlebten, waren die Tumorzellen schwächer gefärbt. Ein weiterer signifikanter Zusammenhang zeigte sich zwischen dem Median des OS und der Färbereaktion der mit anti-VEGFR 2- AK gefärbten Tumorzellen (Mann-Whitney-U-Test  $p=0,047$ ). Bei den Patienten, die kürzer als 70,9 Monate überlebt haben, waren die Tumorzellen schwächer gefärbt. Zwischen der Intensität der Färbereaktionen der AK und der lokoregionären Tumorkontrolle konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang herausgearbeitet werden (Tabelle 8).



Tabelle 8: Gemeinsame Analyse der Ergebnisse der  $\beta$ 3-Integrin- und VEGFR 2-IHC und der Prognose der Patienten

**$\beta$ 3-Integrin-Untereinheit**

	OS <70,9 Monate n=23	OS >70,9 Monate n=23	Rezidiv	
			ja	nein
<b>Tumorzellen</b>				
schwach reaktiv	12	20	4	28
stark reaktiv	11	3	3	11
p-Wert*	0,023		0,658	

**Entzündungszellen**

schwach reaktiv	10	14	5	19
stark reaktiv	13	9	2	20
p-Wert*	0,376		0,418	

**VEGFR 2**

**Gefäßendothel**

schwach reaktiv	8	9	2	15
stark reaktiv	15	14	5	24
p-Wert*	1,0		0,698	

**Tumorzellen**

schwach reaktiv	20	13	4	29
stark reaktiv	3	10	3	10
p-Wert*	0,047		0,385	

\*Mann-Whitney-U-Test, exakte Signifikanz, 2-seitig, OS: overall survival, mediane Überlebenszeit 70,9 Monate

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit des Integrin-Rezeptors und des VEGFR 2 in lokal umschriebenen humanen Oropharynxkarzinomen und zugehörigen Lymphknotenmetastasen untersucht. Dabei waren die Patientenproben so ausgewählt, dass in der Hälfte der ausgesuchten Fälle Lymphknotenmetastasen vorhanden waren. Es wurde anschließend das Ausmaß der Expression mit T- und N-Kategorie der Tumoren und dem onkologischen Outcome der Patienten untersucht.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen T- und N-Kategorien der Tumoren und der Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und des VEGFR 2 festgestellt werden. Auch das Auftreten eines lokalen Tumorrezidives korrelierte nicht mit der Expression der gewählten Rezeptoren. Ein Trend ergab sich für eine verbesserte lokoregionäre Tumorkontrolle bei Patienten, die N+ klassifiziert waren. Dies könnte auf die regelhaft durchgeführte adjuvante Radiotherapie bei diesen Patienten zurück zu führen sein. Als signifikant stellte sich der Zusammenhang zwischen dem Median des Gesamtüberlebens (70,9 Monate) und der Färbereaktionen der mit anti-Integrin  $\beta 3$ - und anti-VEGFR 2-Antikörpern gefärbten Tumorzellen heraus. Eine schwächere Färbereaktion der mit anti-Integrin  $\beta 3$ -AK gefärbten Tumorzellen war signifikant häufiger in der Hälfte der Stichprobe mit längerem als dem Median des Gesamtüberlebens (70,9 Monate) zu finden. Eine schwächere Färbereaktion der mit anti-VEGFR 2-AK gefärbten Tumorzellen zeigte sich hingegen bei Patienten mit einem kürzeren Überleben als 70,9 Monate.

### 6.1. $\beta 3$ -Integrin-Rezeptor-Untereinheit

Integrine gehören zur Familie der Zelloberflächenrezeptoren, sie verbinden Zellen miteinander und mit der extrazellulären Matrix. Zusätzlich zu ihrer Funktion als Zelladhäsionsmolekül haben sie auch eine wichtige Bedeutung in der Signalübertragung zwischen den Zellen (Switala-Jelen, Dabrowska et al. 2004). Es wurden zwei verschiedene Integrin-Rezeptoren, die die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit tragen beschrieben: Integrin  $\alpha IIb\beta 3$  und Integrin  $\alpha v\beta 3$ . Integrin  $\alpha IIb\beta 3$  ist der sogenannte Thrombozytenrezeptor gpIIb/IIIa, er wird u.a. auf Thrombozyten

und Megakaryozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen Thrombozytenadhäsion und -aggregation. In pathologische thrombotische Ereignisse kann er ebenfalls involviert sein (Switala-Jelen, Dabrowska et al. 2004). Integrin  $\alpha v \beta 3$  ist der Vitronektin-Rezeptor, dieser Rezeptor wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, vorzugsweise von Endothelzellen während der Angiogenese exprimiert. Er spielt eine wichtige Rolle für Migration, Proliferation und Überleben dieser Zellen (Avraamides, Garmy-Susini et al. 2008).

Ein verstärktes Vorkommen der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit wurde auch in Tumorzellen und Endothelzellen zahlreicher humaner Tumorentitäten beschrieben. Hierdurch wurde die Vermutung nahe gelegt, dass die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit eine Rolle in tumorinduzierter Angiogenese und Tumorprogression und –metastasierung besitzt und damit auch ein möglicher Einfluss auf das onkologische Outcome der Patienten besteht (Desgrosellier and Cheresch 2010).

#### 6.1.1. Expression der $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und Tumorprogression

In zahlreichen Studien wurde die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit als Angiogenese- und Tumorpromoter beschrieben (Brooks, Clark et al. 1994; Nemeth, Cher et al. 2003; Jin and Varner 2004). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit auch inhibierend auf Angiogenese und Tumorprogression wirken kann (Reynolds, Wyder et al. 2002; Kanamori, Vanden Berg et al. 2004). Bachmann et al. konnten zeigen, dass eine starke Expression in Tumorzellen mit der Tumordicke und der Gefäßinvasion von Melanomen korrelierte (Bachmann, Ladstein et al. 2008). In einer Studie von Neto et al. konnte dagegen keine Korrelation zwischen der Expression und der Tumordicke oder dem Vorhandensein von Metastasen von Melanomen herausgearbeitet werden (Neto, Pantaleao et al. 2007). Danen et al. zeigten, dass durch einen DNA Transfer von der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit in Melanomzellen die Invasion und Metastasierung inhibiert werden konnte (Danen, van Kraats et al. 1996). In Prostatakarzinomen konnte der positive Zusammenhang zwischen einer Überexpression von Integrin  $\alpha v \beta 3$  und Knochenmetastasen gezeigt werden (McCabe, De et al. 2007). Hosotani et al. konnten zeigen, dass Primärtumoren des Pankreaskarzinoms mit

Lymphknotenmetastasen eine signifikant höhere Expression von der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit haben als Tumore ohne Lymphknotenmetastasen (Hosotani, Kawaguchi et al. 2002). In einer Studie von Marchan et al. konnten beim Pankreaskarzinom gezeigt werden, dass die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit zu einer gesteigerten Migration der Zellen führte, aber in einem in vivo Modell die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit gleichzeitig zur Reduktion von Tumorwachstum führte (Marchan, Perez-Torras et al. 2010). Insgesamt erscheint also die Rolle einer gesteigerten Expression der  $\beta 3$ -Rezeptor-Untereinheit des Integrin-Rezeptors für Tumorprogression und Metastasierung uneinheitlich. Zusammengefasst konnte in wissenschaftlichen Arbeiten eine wichtige und unter Umständen widersprüchliche Rolle der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit in der Regulation von Zellüberleben beschrieben werden. Dabei scheint sich herauszustellen, dass zusätzlich zur ligandenabhängigen Wirkung eine positive oder negative Wirkung von ungebundenen Rezeptormolekülen auf das Tumorzellüberleben besteht.

Eine im Bezug auf die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit besonders umfangreich untersuchte Tumorentität ist das Glioblastom. Das Glioblastom ist der häufigste bösartige hirneigene Tumor bei Erwachsenen und hat insgesamt eine sehr schlechte Prognose. Die Gesamtüberlebenszeit beträgt im Median etwa 15 Monate und nach 2 Jahren leben nur noch 25-30% der Patienten (Reardon, Nabors et al. 2008). Schnell et al. konnte zeigen, dass die Expression von der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit nicht nur in Gefäßendothelien sondern v.a. auch in Tumorzellen in Glioblastomen signifikant höher war als in niedriggradigen Gliomen. Die Expression korrelierte mit Tumorgrad und Invasion (Schnell, Krebs et al. 2008). Die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit scheint zusammengefasst Auswirkungen auf die Angiogenese und Tumorgenese in Glioblastomen zu haben. In zahlreichen Phase I- und II- Studien mit einem Integrin-Inhibitor (Cilengitide in Kombination mit einer Standard Therapie) konnten positive Effekte auf das Gesamtüberleben und die progressionsfreie Zeit gezeigt werden. Die erste Phase III- Studie für Cilengitide wurde 2008 für neu diagnostizierte Glioblastome auf den Weg gebracht. Ende 2012 sollen Ergebnisse vorliegen (Mas-Moruno, Rechenmacher et al. 2010).

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich, wie Oropharynxkarzinome, zählen zu den hoch vaskularisierten Tumoren und exprimieren die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit (Georgolios, Batistatou et al. 2005). Die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit wurde primär in Endothelzellen innerhalb von Tumoren beschrieben. In der Untersuchung von Beer et al. wurde nur in einer von 7 Proben auch in Tumorzellen eine Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheiten beschrieben (Beer, Grosu et al. 2007). In der hier vorliegenden Arbeit wurde an einem größeren Patientenkollektiv in Entzündungszellen als auch in Tumorzellen die Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit beschrieben und ausgewertet.

In wissenschaftlichen Arbeiten mit Beschreibung des onkologischen Outcomes der Patienten in Abhängigkeit der  $\beta 3$ -Integrin-Rezeptor-Untereinheit wurden ebenfalls uneinheitliche Ergebnisse gezeigt. Partheen et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass Patienten mit einem ovarialen Adenokarzinom, die länger als 5 Jahre nach Erstdiagnose überlebten eine signifikant höhere Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit aufwiesen als Patienten mit einer kürzeren Überlebenszeit (Partheen, Levan et al. 2009). Kaur et al. zeigten, dass eine Überexpression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit in Ovarialkarzinomen mit einem signifikant längerem krankheitsfreien und Gesamtüberleben korrelierte. (Kaur, Kenny et al. 2009) Dahingegen konnten Gruber et al. demonstrieren, dass ein erhöhtes Vorkommen von der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit in Cervixkarzinomzellen mit einem reduzierten progressionsfreien, fernmetastasenfreien und krankheitsspezifischen Überleben korrelierte (Gruber, Hess et al. 2005). Chu et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit Magenkarzinomen signifikant niedriger war bei Tumoren mit einer starken Expression von der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit im Gegensatz zu Tumoren mit einer schwächeren Expression (Chu, Ye et al. 2008). Auch Li et al. konnten ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen einer starken Expression von der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und einer signifikanten niedrigeren 5-Jahres-Überlebensrate bei Magenkarzinomen zeigen (Li, Ye et al. 2008). In der hier vorliegenden Arbeit konnte immunhistochemisch keine Korrelation der Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und T- bzw. N-Kategorie beim Oropharynxkarzinom gezeigt werden. Auch das Auftreten eines Rezidives war nicht mit einer erhöhten Expression verknüpft. Es zeigte sich aber ein signifikanter Zusammenhang zwischen Expressionsgrad und Überleben. Patienten

deren Tumorzellen eine schwächere Färbereaktion aufwiesen, waren signifikant häufiger in der Patientengruppe mit längerem Gesamtüberleben auffindbar. Möglicherweise zeigt eine starke Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit je nach Tumortyp einen unterschiedlichen Zusammenhang zum onkologischen Outcome der Patienten an. Eine andere mögliche Erklärung liegt in den verwendeten Methoden und Probenmaterial in publizierten Originalarbeiten. So sind beispielsweise Auswertung und Methodik der IHC nicht standardisiert und generell wurden bisher nur Kollektive mit geringen Zahlen von Probanden publiziert.

Dass die  $\beta 3$ -Integrin-Rezeptor-Untereinheit auch in Kopf-Hals-Tumoren in der Angiogenese und als Tumorpromoter aktiv sein könnte, zeigt eine Einzelfallstudie. Ein Patient mit einem 15cm großen Tumor, das 4. Rezidiv eines Plattenepithelkarzinoms ursprünglich ausgehend vom Kiefer, wurde mit einer Kombination aus Cilengitide und Gemcitabin supportiv behandelt. Anderen Therapieoptionen standen für diesen Patienten nicht mehr zur Verfügung. Unter der Therapie dieser Kombination kam es zu einer partiellen Remission (Raguse, Gath et al. 2004). In der klinischen Phase II Studie ADVANTAGE wurde die Sicherheit und Effektivität von Cilengitide in Kombination mit unterschiedlichen Regimen aus Cisplatin, 5-Fluorouracil und Cetuximab bei Patienten mit rezidiviertem/metastasiertem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Die kürzlich erschienenen Ergebnisse zeigten keinen Effekt von Cilengitide auf die progressionsfreie Überlebenszeit (Vermorken, Peyrade et al. 2012). Weitere Studien müssen folgen um den wahren Nutzen von Cilengitide bei diesem Patientenklientel zu untersuchen.

#### 6.1.2. Immunzellen und die $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit

Zusätzlich zur Rolle von Integrin-Rezeptoren in Tumorzellen wurde der Rezeptor in zahlreichen Wirtszellen wie Endothel, Fibroblasten, Perizyten, Knochenmarkszellen und Entzündungszellen beschrieben. Die einzelnen Funktionen sind dabei aufgrund der ausgesprochenen Heterogenität der Rezeptor-Untereinheiten und deren respektiver Funktionen nicht detailliert beschrieben. Für die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit ist eine Expression insbesondere in Leukozyten wie Monozyten, neutrophilen Granulozyten (Thompson, Wakelin et al.

2000; Janardhan, Appleyard et al. 2004), Makrophagen und Lymphozyten (Nozawa, Chiu et al. 2006) beschrieben. Die  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheit ist möglicherweise in die Transmigration von Leukozyten (Thompson, Wakelin et al. 2000) und Lymphozyten (Lacy-Hulbert, Ueno et al. 2007) involviert.

Die Rolle von Immuninfiltraten bei Tumorprogression und -metastasierung wird häufig diskutiert. Die Präsenz von Leukozyten, v.a. neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, ist die Konsequenz einer Immunreaktion gegen den Tumor, erst die angeborene, später, wenn das Immunsystem tumorassoziierte Antigene erkennt, die erworbene Abwehr (Brigati, Noonan et al. 2002). Dass die Tumordinfiltration von Leukozyten prognostisch immer positiv ist, hat sich in den letzten Jahren nicht bestätigt. V.a. der Umstand, dass Leukozyten angiogene Faktoren produzieren können, gibt Hinweis darauf, dass sie mögliche stimulierende Effekte auf die Tumorangiogenese haben (Bodey, Bodey et al. 2000). Polymorphkernige Leukozyten, v.a. die neutrophilen Granulozyten, sind wichtiger Bestandteil des Immuninfiltrates in Tumoren. Über Phagozytose können sie Zellen aufnehmen und töten (Scapini, Nesi et al. 2002). Sie können als wichtige Antitumorzellen verstanden werden. In klinischen Studien konnten widersprüchliche Effekte in Tumoren gezeigt werden. So war das gesteigerte Vorkommen von tumordinfiltrierenden Neutrophilen mit einem schlechteren Outcome von Patienten mit einem bronchioloalveolärem Karzinom verknüpft (Bellocq, Antoine et al. 1998). Anders bei Tumoren des Magen, dort korrelierte die Infiltration der Neutrophilen mit einer guten Prognose (Caruso, Bellocchio et al. 2002). Neutrophile können sowohl antiangiogene Faktoren wie Angiostatin und Interferon- $\gamma$  (Brigati, Noonan et al. 2002) als auch angiogene Faktoren wie VEGF, Interleukin-8 (Schaidt, Oka et al. 2003) und Matrix-Metalloproteinasen produzieren und sezernieren (Shamamian, Schwartz et al. 2001). Auch Makrophagen spielen eine Rolle im Immuninfiltrat in Tumoren. Tumorassoziierte Makrophagen sind fähig Tumorzellen zu töten und antiangiogene Faktoren freizugeben, aber sie können auch über angiogene Faktoren Tumorstadium stimulieren. Die Präsenz dieser Makrophagen war assoziiert mit reduzierten rezidivfreien- und Gesamtüberleben von Patientinnen mit Cervixtumor (Fujimoto, Sakaguchi et al. 2000) oder Mammakarzinom (Leek, Lewis et al. 1996). Die Makrophageninfiltration korrelierte positiv mit dem Tumorgrad und der

Angiogenese in Melanomen (Torisu, Ono et al. 2000). In anderen Tumoren wie z.B. Magen- (Migita, Sato et al. 1999) oder Prostatakarzinomen (Shimura, Yang et al. 2000) scheint die Anwesenheit von tumorassoziierten Makrophagen mit einer besseren Prognose korreliert zu sein. Zusammengefasst stimulieren und inhibieren Immuninfiltrate abhängig vom Tumortyp, dem Zeitpunkt, der Anzahl und Aktivierungsstatus der Zellen Angiogenese und Tumorgenese (Brigati, Noonan et al. 2002).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen eine Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit von Entzündungszellen festgestellt. Es ergab sich aber keine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Färbereaktion der  $\beta 3$ -Integrin-IHC an Entzündungszellen und der T- und N-Kategorien und onkologischen Outcome-Parametern der Patienten. Möglicherweise gelang aufgrund der fehlenden Subklassifizierung der jeweiligen entzündlichen Infiltrate keine Herausarbeitung eines Zusammenhangs zur Tumorprogression in dem hier untersuchten Kollektiv. Unabhängig davon sind bis jetzt aber auch keine einheitlichen Korrelationen zu einer immunhistochemischen Expression in bestimmten Zelltypen in humanen Tumoren beschrieben.

Integrine spielen sicher eine Rolle bei der Progression solider Tumoren, jedoch ist die Rolle respektiver Untereinheiten und beispielsweise spezifischer Wirtszellen im Immuninfiltrat bisher ungeklärt.

Zusammengefasst ist ein Zusammenhang zwischen Integrin-Rezeptoren und Progression humaner Tumoren beschrieben, insbesondere beim Glioblastom sind im Gegensatz zu anderen humanen Tumorentitäten die Ergebnisse relativ einheitlich. Beim Glioblastom konnte dies beispielsweise bereits zur Einführung von Prüfsubstanzen in klinische Studien führen. Im hier untersuchten Kollektiv waren die Ergebnisse dahingehend zu interpretieren, dass eine schwächere Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit in Tumorzellen bei Patienten mit Oropharynxkarzinom und längerem Überleben zu finden war. Die Ergebnisse sind jedoch im Wesentlichen aufgrund des kleinen Kollektivs und der nicht-standardisierten Untersuchungstechnik mit Zurückhaltung zu interpretieren. Dafür



sprechen auch die teils diametralen Aussagen, die anhand anderer humaner Tumorentitäten bei vergleichbarem experimentellen Setting getroffen wurden.

## **6.2. VEGF-Rezeptor 2**

Der VEGFR 2 gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und wird in Gefäßendothelzellen exprimiert. Er ist hochaffin für VEGF-A und übermittelt an Gefäßendothelzellen während der Angiogenese Endothelzellproliferation, -überleben, -migration und Lumenformation. Der VEGFR 2 besitzt somit eine Schlüsselrolle in der Angiogenese (Shibuya 2003). Neben der, so früher geglaubten, spezifischen Expression in Gefäßendothelzellen wurde VEGFR 2 mittlerweile auf verschiedensten Zellen nachgewiesen. Besonders interessant ist die Expression dieses Rezeptors in Tumorzellen diverser Tumorentitäten (Masood, Cai et al. 2001). Dies könnte bedeuten, dass VEGFR 2 nicht nur in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, sondern auch in der Karzinogenese beispielsweise solider Tumoren.

Donnem et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass VEGFR 2 in Tumorzellen und Tumorstroma von nicht-kleinzelligen Lungentumoren exprimiert wurde. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression dieses Rezeptors in Tumorzellen ein negativer und im Tumorstroma ein positiver prognostischer Faktor für das krankheitsspezifische Überleben war (Donnem, Al-Saad et al. 2007). Carrillo de Santa Pau et al. konnten auch eine Expression vom VEGFR 2 in Tumorzellen von nicht-kleinzelligen Lungentumoren nachweisen. Die Überexpression von VEGFR 2 korrelierte mit einem verkürzten medianen Überleben über die Tumorstadien. Im Einzelnen korrelierte eine Überexpression von VEGFR 2 in den Stadien III/IV mit einem reduzierten Überleben, jedoch nicht in den Stadien I/II (Carrillo de Santa Pau, Arias et al. 2009). Dieses Resultat stimmt nicht mit den Ergebnissen von Seto et al. überein, bei denen nur Patienten mit Tumoren im Stadium I mit hoher Expression von VEGFR 2 ein verkürztes Überleben aufwiesen (Seto, Higashiyama et al. 2006). Longatto-Filho et al. konnten in einer Studie mit adenosquamösen Cervixkarzinomen zeigen, dass in mehr als zweidrittel aller Fälle Tumorzellen VEGFR exprimierten. Nur vereinzelt zeigte sich eine positive Färbung in Gefäßendothelzellen. Eine Überexpression von VEGFR 2 in Tumorzellen

korrelierte nicht mit dem Gesamtüberleben oder dem Auftreten von Rezidiven, dafür aber mit dem Fehlen von Metastasen. Dieses paradox erscheinende Ergebnis legt nahe, dass alternative Moleküle und Wege bei dieser Tumorentität für die Metastasierung wichtig sein könnten (Longatto-Filho, Pinheiro et al. 2009). Okita et al. konnten eine Expression von VEGFR 2 in tumorassoziierten Gefäßendothelzellen und vereinzelt und weniger stark in Tumorzellen von kolorektalen Tumoren zeigen, wobei kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression und dem Überleben gezeigt werden konnte (Okita, Yamada et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnten Giatromanolaki et al. in ihrer Studie zeigen, dass eine Überexpression von VEGFR 2 in Tumorzellen von kolorektalen Tumoren signifikant mit Tumoren > 6cm und histologisch niedriger differenzierten Tumoren assoziiert war. Jedoch weder die Expression in Tumorzellen noch in Gefäßendothelzellen korrelierte mit dem Überleben. In dieser Studie wurde ein Antikörper gegen aktiviertes phosphoriliertes VEGFR 2 verwendet (Giatromanolaki, Koukourakis et al. 2007).

Über die Expression von VEGFR 2 in Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich sind einige Studien bekannt. Neuchrist et al. konnten die Überexpression in Tumorzellen und Gefäßendothelzellen sowie in Stromazellen, welche sie als postnatale Hämangioblasten deuteten, nachweisen. Den Zusammenhang zwischen der Expression und den klinisch-pathologischen Faktoren und der Prognose untersuchten sie aber nicht (Neuchrist, Erovic et al. 2001). In einer Studie von Sato et.al konnte VEGFR 2 weder in Tumorzellen noch in reifen Gefäßendothelien nachgewiesen werden. Dafür wiesen runde Stromazellen eine vermehrte Expression auf. Die Autoren vermuteten, dass diese Stromazellen Hämangioblasten seien. Die Zahl der VEGFR 2 positiven Stromazellen war in schlechter differenzierten Tumoren signifikant höher (Sato and Takeda 2009). Lalla et al. konnten in ihrer Untersuchung eine Expression von VEGFR 2 in Tumorzellen in allen untersuchten Fällen zeigen. Weiterhin war es ihnen möglich, eine Expression in Makrophagen und Gefäßendothelien in den meisten Proben nachzuweisen, wobei die Endothelzellen eine signifikant schwächere Färbeintensität aufwiesen als die Tumorzellen und Makrophagen. Auch hier wurde der Zusammenhang zwischen der Expression und der Prognose nicht untersucht. Auffallend war dennoch, dass VEGFR 3, welcher v.a. in

Lymphgefäßendothelzellen exprimiert wird, in Tumorzellen und in Gefäßendothelzellen stark exprimiert wurde. Dies legt den Schluss nahe, dass VEGFR 3 möglicherweise auch eine Rolle in der Angiogenese und Tumorgenese von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich haben könnte (Lalla, Boissoneau et al. 2003). Auch Neuchrist et al. konnte eine Expression von VEGFR 3 in Tumorzellen und Gefäßendothelzellen nachweisen (Neuchrist, Erovic et al. 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Expression von VEGFR 2 in Tumorzellen und Gefäßendothelien gezeigt werden. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression in Gefäßendothelien und den klinisch-pathologischen Daten und der Prognose gezeigt werden. Eine Korrelation bestand jedoch zwischen der Expression in den Tumorzellen und der medianen Überlebenszeit. Patienten die kürzer als der Median von 70,9 Monaten in unserem Kollektiv überlebten, zeigten eine schwächere Expression von VEGFR2 in den Tumorzellen.

Die gegensätzlichen und zum Teil paradox wirkenden Aussagen zur möglichen prognostischen Bedeutung dieses Faktors können ihren Ursprung in mehreren Punkten haben. Zum einen weichen die Protokolle für die immunhistochemische Markierung voneinander ab, zum anderen werden in den publizierten Studien unterschiedliche Antikörper benutzt. Ungeklärt ist dabei, ob es einen Unterschied macht, VEGFR 2 im aktivierten phosphorylierten oder im inaktivierten Zustand zu untersuchen. Besonders bei der Auswertung der immunhistochemischen Markierungen durch die anti-VEGFR 2-Antikörper gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Bewertungsschemata. Zusätzlich weichen die Zusammensetzungen der untersuchten Patientengruppen vor allem in Bezug auf Histologie und klinisches Stadium häufig voneinander ab. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob eine hohe Expression von VEGFR 2, und damit höhere Angiogenese mit einem besseren Ansprechen auf eine Strahlentherapie und somit einem verlängerten Überleben korreliert (Pang and Poon 2006). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass andere Faktoren z.B. VEGFR 3 wichtige Faktoren in der Angiogenese und Tumorgenese in Tumoren im Kopf-Hals-Bereich sind.

### **6.3. HPV-Infektion und Angiogenese**

Der Abusus von Tabak und/oder Alkohol gilt als Risikofaktor für die Entstehung einer Oropharynxkarzinoms als gesichert (Epstein, Gorsky et al. 2008). Für einen Teil der Oropharynxkarzinome besteht ein Zusammenhang zwischen der Entstehung des Malignoms und einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) Typ 16 und weniger häufig mit dem HPV Typ 18 als gesichert. Bis zu 60% der Oropharynxkarzinome sind mit dem humanen HPV assoziiert (Wittekindt, Wagner et al. 2012). Diese HPV-positiven Tumoren zeigen durchaus andere klinische und histopathologische Eigenschaften als HPV-negative Tumoren. V.a. jüngere Menschen sind davon betroffen, häufig sind diese Tumore kleiner und meist fehlen die typischen Risikofaktoren für oropharyngeale Tumoren (Argiris, Karamouzis et al. 2008; Psyrri, Prezas et al. 2008).

Ob eine Infektion mit dem HPV 16 zu einer gesteigerten Angiogenese und damit zum „angiogenic switch“ während der Tumorgenese beiträgt, ist noch nicht vollständig geklärt, aber Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Im Falle von cervicalen Karzinomen und einem HPV 16 transgenen Maus-Modell konnten Smith-McCune et. al einen Zusammenhang zwischen einer HPV 16 E6/E7 Genexpression und der gesteigerten Expression von VEGF und einer gesteigerten Mikrovaskularisierung nachweisen. VEGF ist einer der wichtigsten Faktoren der Angiogenese (Smith-McCune, Zhu et al. 1997). Chen et. al konnten einen Zusammenhang zwischen HPV 16 E6/E7 Expression und der Stimulation von Gefäßendothelzellen zur Proliferation und Migration in vivo und in vitro nachweisen (Chen, Li et al. 2007). Ob diese Ergebnisse auf HPV-positive Oropharynxkarzinome übertragbar sind und ob dies eine Konsequenz hat bleibt abzuwarten. Weitere Studien sind dafür nötig.

## 7. Schlussfolgerung

Die mögliche Bedeutung der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und des VEGFR 2 als Prognosefaktoren beim Oropharynxkarzinom ist aufgrund der hier vorgelegten Untersuchung nicht abschließend zu beurteilen. Dennoch ergeben sich Hinweise darauf, dass beide Rezeptoren Einfluss auf die Progression des Oropharynxkarzinoms und dessen Prognose bzw. onkologischem Outcome nehmen. Die  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit erwies sich in der hier vorgelegten Arbeit als ein negativer Prognosefaktor hinsichtlich des Gesamtüberlebens der untersuchten Stichprobe. Ein schwächeres Vorkommen in Tumorzellen korrelierte mit einem verlängerten medianen Überleben. Anders war dies für VEGFR 2, hier war ein schwächeres Vorkommen in Tumorzellen mit einem verkürzten medianen Überleben korreliert, so dass der VEGFR 2 in dieser Arbeit als positiver prognostischer Faktor herausgearbeitet werden konnte.

Es existieren zahlreiche, zum Teil widersprüchliche Studienergebnisse im Zusammenhang mit einer immunhistochemisch dargestellten vermehrten Expression der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und dem VEGFR 2 in soliden humanen Tumoren (auch in Oropharynxkarzinomen) und ihrer prognostischen Relevanz. Es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um die Relevanz dieser Rezeptoren in der Progression von Tumoren und dem onkologischen Outcome abschließend zu beurteilen. Zur Bedeutung der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit und des VEGFR 2 in der antiangiogenen Therapie werden aktuell in mehreren präklinischen und klinischen Studien Patienten rekrutiert, in denen zum Beispiel AK gegen diese Rezeptoren an Tumoren getestet werden. Abschließende Ergebnisse stehen noch aus.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Argiris, A., M. V. Karamouzis, et al. (2008). "Head and neck cancer." Lancet **371**(9625): 1695-709.
- Argiris, A., A. P. Kotsakis, et al. (2012). "Cetuximab and bevacizumab: preclinical data and phase II trial in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck cancer." Ann Oncol.
- Avraamides, C. J., B. Garmy-Susini, et al. (2008). "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis." Nat Rev Cancer **8**(8): 604-17.
- Bachmann, I. M., R. G. Ladstein, et al. (2008). "Tumor necrosis is associated with increased alphavbeta3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas." BMC Cancer **8**: 362.
- Beer, A. J., A. L. Grosu, et al. (2007). "[18F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of alphavbeta3 expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." Clin Cancer Res **13**(22 Pt 1): 6610-6.
- Bellocq, A., M. Antoine, et al. (1998). "Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome." Am J Pathol **152**(1): 83-92.
- Bodey, B., B. Bodey, Jr., et al. (2000). "Controversies on the prognostic significance of tumor infiltrating leukocytes in solid human tumors." Anticancer Res **20**(3A): 1759-68.
- Brigati, C., D. M. Noonan, et al. (2002). "Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?" Clin Exp Metastasis **19**(3): 247-58.
- Brooks, P. C., R. A. Clark, et al. (1994). "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." Science **264**(5158): 569-71.
- Canto, M. T. and S. S. Devesa (2002). "Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998." Oral Oncol **38**(6): 610-7.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-95.
- Carrillo de Santa Pau, E., F. C. Arias, et al. (2009). "Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer." Cancer **115**(8): 1701-12.
- Caruso, R. A., R. Bellocco, et al. (2002). "Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy." Mod Pathol **15**(8): 831-7.
- Chen, W., F. Li, et al. (2007). "Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior." Virology **367**(1): 168-74.
- Chu, Y. Q., Z. Y. Ye, et al. (2008). "Relationship between cell adhesion molecules expression and the biological behavior of gastric carcinoma." World J Gastroenterol **14**(13): 1990-6.
- Cognetti, D. M., R. S. Weber, et al. (2008). "Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm." Cancer **113**(7 Suppl): 1911-32.
- Danen, E. H., A. A. van Kraats, et al. (1996). "Integrin beta 3 cDNA transfection into a highly metastatic alpha v beta 3-negative human melanoma cell line inhibits invasion and experimental metastasis." Biochem Biophys Res Commun **226**(1): 75-81.
- Demetri, G. D., A. T. van Oosterom, et al. (2006). "Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial." Lancet **368**(9544): 1329-38.

- Desgrosellier, J. S. and D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer **10**(1): 9-22.
- Donnem, T., S. Al-Saad, et al. (2007). "Inverse prognostic impact of angiogenic marker expression in tumor cells versus stromal cells in non small cell lung cancer." Clin Cancer Res **13**(22 Pt 1): 6649-57.
- Eichholz, A., S. Merchant, et al. (2010). "Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management." Onco Targets Ther **3**: 69-82.
- Epstein, J. B., M. Gorsky, et al. (2008). "Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma: role of primary care physicians." Can Fam Physician **54**(6): 870-5.
- Faivre, S., G. Demetri, et al. (2007). "Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development." Nat Rev Drug Discov **6**(9): 734-45.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.
- Folkman, J. (1972). "Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors." Ann Surg **175**(3): 409-16.
- Folkman, J. (2003). "Fundamental concepts of the angiogenic process." Curr Mol Med **3**(7): 643-51.
- Fujimoto, J., H. Sakaguchi, et al. (2000). "Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers." Cancer Res **60**(10): 2632-5.
- Fury, M. G., N. Y. Lee, et al. (2012). "A phase 2 study of bevacizumab with cisplatin plus intensity-modulated radiation therapy for stage III/IVB head and neck squamous cell cancer." Cancer.
- Georgolios, A. K., A. Batistatou, et al. (2005). "Integrins in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): a review of the current literature." Cell Commun Adhes **12**(1-2): 1-8.
- Giatromanolaki, A., M. I. Koukourakis, et al. (2007). "Activated VEGFR2/KDR pathway in tumour cells and tumour associated vessels of colorectal cancer." Eur J Clin Invest **37**(11): 878-86.
- Gruber, G., J. Hess, et al. (2005). "Correlation between the tumoral expression of beta3-integrin and outcome in cervical cancer patients who had undergone radiotherapy." Br J Cancer **92**(1): 41-6.
- Hermans, R. (2005). "Oropharyngeal cancer." Cancer Imaging **5 Spec No A**: S52-7.
- Holmes, K., O. L. Roberts, et al. (2007). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition." Cell Signal **19**(10): 2003-12.
- Hosotani, R., M. Kawaguchi, et al. (2002). "Expression of integrin alphaVbeta3 in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis." Pancreas **25**(2): e30-5.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.
- Janardhan, K. S., G. D. Appleyard, et al. (2004). "Expression of integrin subunits alphav and beta3 in acute lung inflammation." Histochem Cell Biol **121**(5): 383-90.
- Jin, H. and J. Varner (2004). "Integrins: roles in cancer development and as treatment targets." Br J Cancer **90**(3): 561-5.
- Kanamori, M., S. R. Vanden Berg, et al. (2004). "Integrin beta3 overexpression suppresses tumor growth in a human model of gliomagenesis: implications

- for the role of beta3 overexpression in glioblastoma multiforme." Cancer Res **64**(8): 2751-8.
- Kane, R. C., A. T. Farrell, et al. (2006). "Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(24): 7271-8.
- Karkkainen, M. J. and T. V. Petrova (2000). "Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." Oncogene **19**(49): 5598-605.
- Kaur, S., H. A. Kenny, et al. (2009). "{beta}3-integrin expression on tumor cells inhibits tumor progression, reduces metastasis, and is associated with a favorable prognosis in patients with ovarian cancer." Am J Pathol **175**(5): 2184-96.
- Lacy-Hulbert, A., T. Ueno, et al. (2007). "Beta 3 integrins regulate lymphocyte migration and cytokine responses in heart transplant rejection." Am J Transplant **7**(5): 1080-90.
- Lalla, R. V., D. S. Boissoneau, et al. (2003). "Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(8): 882-8.
- Landen, C. N., T. J. Kim, et al. (2008). "Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer." Neoplasia **10**(11): 1259-67.
- Leek, R. D., C. E. Lewis, et al. (1996). "Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma." Cancer Res **56**(20): 4625-9.
- Li, S. G., Z. Y. Ye, et al. (2008). "Correlation of integrin beta3 mRNA and vascular endothelial growth factor protein expression profiles with the clinicopathological features and prognosis of gastric carcinoma." World J Gastroenterol **14**(3): 421-7.
- Llovet, J. M., S. Ricci, et al. (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." N Engl J Med **359**(4): 378-90.
- Longatto-Filho, A., C. Pinheiro, et al. (2009). "Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma." BMC Cancer **9**: 212.
- Marchan, S., S. Perez-Torras, et al. (2010). "Dual effects of beta3 integrin subunit expression on human pancreatic cancer models." Cell Oncol (Dordr) **34**(4): 393-405.
- Mas-Moruno, C., F. Reichenmacher, et al. (2010). "Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation." Anticancer Agents Med Chem **10**(10): 753-68.
- Masood, R., J. Cai, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors." Blood **98**(6): 1904-13.
- McCabe, N. P., S. De, et al. (2007). "Prostate cancer specific integrin alphavbeta3 modulates bone metastatic growth and tissue remodeling." Oncogene **26**(42): 6238-43.
- Migita, T., E. Sato, et al. (1999). "Differing expression of MMPs-1 and -9 and urokinase receptor between diffuse- and intestinal-type gastric carcinoma." Int J Cancer **84**(1): 74-9.
- Moncrieff, M., J. Sandilla, et al. (2009). "Outcomes of primary surgical treatment of T1 and T2 carcinomas of the oropharynx." Laryngoscope **119**(2): 307-11.
- Motzer, R. J., T. E. Hutson, et al. (2007). "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma." N Engl J Med **356**(2): 115-24.



- Nemeth, J. A., M. L. Cher, et al. (2003). "Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases." Clin Exp Metastasis **20**(5): 413-20.
- Neto, D. S., L. Pantaleao, et al. (2007). "Alpha-v-beta3 integrin expression in melanocytic nevi and cutaneous melanoma." J Cutan Pathol **34**(11): 851-6.
- Neuchrist, C., B. M. Erovic, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck." Head Neck **25**(6): 464-74.
- Neuchrist, C., B. M. Erovic, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck." Laryngoscope **111**(10): 1834-41.
- Nguyen, N. P., P. Vos, et al. (2007). "Concurrent chemoradiation for locally advanced oropharyngeal cancer." Am J Otolaryngol **28**(1): 3-8.
- Nozawa, H., C. Chiu, et al. (2006). "Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(33): 12493-8.
- Okita, N. T., Y. Yamada, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer." Jpn J Clin Oncol **39**(9): 595-600.
- Pang, R. W. and R. T. Poon (2006). "Clinical implications of angiogenesis in cancers." Vasc Health Risk Manag **2**(2): 97-108.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Partheen, K., K. Levan, et al. (2009). "External validation suggests Integrin beta 3 as prognostic biomarker in serous ovarian adenocarcinomas." BMC Cancer **9**: 336.
- Psyrrri, A., L. Prezas, et al. (2008). "Oropharyngeal cancer." Clin Adv Hematol Oncol **6**(8): 604-12.
- Raguse, J. D., H. J. Gath, et al. (2004). "Cilengitide (EMD 121974) arrests the growth of a heavily pretreated highly vascularised head and neck tumour." Oral Oncol **40**(2): 228-30.
- Reardon, D. A., L. B. Nabors, et al. (2008). "Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme." Expert Opin Investig Drugs **17**(8): 1225-35.
- Reynolds, L. E., L. Wyder, et al. (2002). "Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins." Nat Med **8**(1): 27-34.
- Sato, H. and Y. Takeda (2009). "VEGFR2 expression and relationship between tumor neovascularization and histologic characteristics in oral squamous cell carcinoma." J Oral Sci **51**(4): 551-7.
- Scapini, P., L. Nesi, et al. (2002). "Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils." J Immunol **168**(11): 5798-804.
- Schaider, H., M. Oka, et al. (2003). "Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8." Int J Cancer **103**(3): 335-43.
- Schnell, O., B. Krebs, et al. (2008). "Expression of integrin alphavbeta3 in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature." Brain Pathol **18**(3): 378-86.

- Seto, T., M. Higashiyama, et al. (2006). "Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer." Lung Cancer **53**(1): 91-6.
- Shamamian, P., J. D. Schwartz, et al. (2001). "Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis." J Cell Physiol **189**(2): 197-206.
- Shiboski, C. H., B. L. Schmidt, et al. (2005). "Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years." Cancer **103**(9): 1843-9.
- Shibuya, M. (2003). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E." Cancer Sci **94**(9): 751-6.
- Shibuya, M. (2006). "Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis." J Biochem Mol Biol **39**(5): 469-78.
- Shimura, S., G. Yang, et al. (2000). "Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression." Cancer Res **60**(20): 5857-61.
- Sloan, E. K., N. Pouliot, et al. (2006). "Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone." Breast Cancer Res **8**(2): R20.
- Smith-McCune, K., Y. H. Zhu, et al. (1997). "Cross-species comparison of angiogenesis during the premalignant stages of squamous carcinogenesis in the human cervix and K14-HPV16 transgenic mice." Cancer Res **57**(7): 1294-300.
- Switala-Jelen, K., K. Dabrowska, et al. (2004). "The biological functions of beta3 integrins." Folia Biol (Praha) **50**(5): 143-52.
- Thompson, R. D., M. W. Wakelin, et al. (2000). "Divergent effects of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and beta 3 integrin blockade on leukocyte transmigration in vivo." J Immunol **165**(1): 426-34.
- Torisu, H., M. Ono, et al. (2000). "Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha." Int J Cancer **85**(2): 182-8.
- Veikkola, T., M. Karkkainen, et al. (2000). "Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors." Cancer Res **60**(2): 203-12.
- Vermorken, J. B., F. Peyrade, et al. (2012). "Cilengitide with cetuximab, cisplatin, and 5-FU in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: The ADVANTAGE phase II trial." J Clin Oncol **30**.
- Walvekar, R. R., R. J. Li, et al. (2008). "Role of surgery in limited (T1-2, N0-1) cancers of the oropharynx." Laryngoscope **118**(12): 2129-34.
- Warnakulasuriya, K. A., D. Robinson, et al. (2003). "Multiple primary tumours following head and neck cancer in southern England during 1961-98." J Oral Pathol Med **32**(8): 443-9.
- Wiesmeth, A., Wollenberg, B. (2003). MANUAL Kopf-Hals-Malignome. München, Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag München.
- Wittekind, C., Meyer, H.-J. (2010). TNM Klassifikation maligner Tumoren Weinheim, Wiley-VCH.
- Wittekindt, C., S. Wagner, et al. (2012). "[Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer]." Laryngorhinootologie **91 Suppl 1**: S1-26.

## 9. Anlagen

### 9.1. Lebenslauf

#### Allgemeine Daten

---

Name	Mandy Laun-Hartung, geb. Hartung
Anschrift	Wettmershagener Straße 18a, 38442 Wolfsburg
Geburtsdatum und -ort	27. Juli 1984 in Mühlhausen/Thüringen
Familienstand	verheiratet, keine Kinder

#### Schul Ausbildung

---

09/1991 - 06/1995	Staatliche Grundschule Niederdorla
09/1995 - 06/2003	Staatliches Gymnasium Oberdorla
06/2003	Abitur

#### Studium

---

10/2003 - 03/2010	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Staatsexamen
01/2010	Beginn der Bearbeitung des Promotionsthemas
04/2010 - 09/2010	Promotionsstudium an der FSU Jena
seit 10/2010	Assistenzärztin für Anästhesiologie und Intensivmedizin im Städtischen Klinikum Braunschweig

## **9.2. Danksagung**

Vor allem Herrn Privatdozent Dr. med. Claus Wittekindt bin ich für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation, seine umfassende Unterstützung bei der Klärung von Problemen und seinem Engagement während der Entstehung dieser Arbeit und der Erstellung des Manuskripts zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. med. Orlando Guntinas-Lichius möchte ich für die Möglichkeit danken, an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität zu promovieren. Ich danke für die Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Christian Mawrin für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Arbeitsplatzes sowie der Geräte und Materialien und für die Unterstützung bei der Erstellung der immunhistochemischen Färbeprotokolle.

Des Weiteren danke ich Herrn Professor Dr. med. Iver Petersen für die Bereitstellung des wissenschaftlichen Arbeitsplatzes.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau König und Frau Bergholz für die Unterstützung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate.

Ein großes Dankeschön geht an Christian, der mir immer zur Seite stand und mich während jeden Tiefs unermüdlich neu motivierte.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die es mir ermöglicht haben, Medizin zu studieren und damit auch die vorliegende Dissertation zu erstellen. Vielen Dank für die liebevolle Unterstützung.

### **9.3. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Privatdozent Dr. med. Claus Wittekindt, Professor Dr. med. Orlando Guntinas-Lichius, Professor Dr. med. Christian Mawrin,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Wolfsburg, den